

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## 1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotnická technika a informatika



**Bc. Jakub Machálek**

Vliv pracovní zátěže na rané stádium vývoje převodního systému srdečního

Effects of Mechanical Loading on Early Conduction System Differentiation

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Doc. MUDr. David Sedmera, PhD.

Praha 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

Souhlasím – Nesouhlasím<sup>\*</sup>

V Praze, 23.05.2011

Jméno – Příjmení (hůlkovým písmem)

Podpis

---

<sup>\*</sup> Nehodící se škrtněte

## Poděkování

Prvořadě chci poděkovat přednostovi Anatomického ústavu 1. LF UK profesoru MUDr. Miloši Grimovi, DrSc., za možnost vypracovat svou bakalářskou práci na půdě tohoto prestižního ústavu.

Dále můj velký obdiv a dík patří skvělému člověku a velkému odborníkovi v oboru, který se ochotně ujal vedení této práce a věnoval mi tak spoustu jak pracovního, tak i svého volného času, trpělivosti a odborných znalostí. Je jím Doc. MUDr. David Sedmera, PhD.

V neposlední řadě chci též poděkovat postgraduální studentce Mgr. Barboře Šebestové, která mi byla nápomocna při optickém mapování a imunohistochemických reakcích. A též kolektivu laborantů, jmenovitě Evě Kluzákové, Mgr. Markétě Pleschnerové a Bc. Tomáši Tůmovi, za provedení, zaučení a cenné rady v oblasti histochemie a imunohistochemie.

## Obsah

<b>ABSTRAKT.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
1.1. Úvod.....	10
1.2. Funkční anatomie srdce .....	13
1.2.1. Funkční uspořádání PSS .....	14
1.2.2. Princip vzniku a šíření akčního potenciálu .....	16
1.2.3. Elektricko-mechanická činnost srdce.....	17
1.2.4. Řízení činnosti srdce .....	18
1.3. Vývoj PSS u kuřecího modelu .....	19
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>22</b>
2.1. Inkubace 24hodin ze 3. na 4. den.....	22
2.2. Inkubace 24hodin ze 4. na 5.den.....	22
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>24</b>
3.1. Materiály a přístroje .....	24
3.1.1. Chemikálie .....	24
3.1.2. Roztoky a pufry.....	25
3.1.3. Přístrojové vybavení.....	25
3.1.4. Softwarové vybavení.....	26
3.2. Metody .....	27
3.2.1. Inkubace vajec.....	27
3.2.2. Explantace .....	27
3.2.3. Mechanické zatížení silikonovým olejem.....	29
3.2.4. Kultivace explantovaných srdcí .....	31
3.2.5. Optické mapování vysokorychlostní digitální kamerou .....	32
3.2.6. Konfokální mikroskopování.....	48
3.2.7. Imunohistochemie .....	49
3.3. Statistické vyhodnocení .....	53
3.3.1. Pearsonův test dobré shody – Chí kvadrát ( $\chi^2$ ) .....	53
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>54</b>
4.1. Inkubace 24hodin ze 3. na 4. den.....	54

4.2. Inkubace 24hodin ze 4. na 5.den.....	60
<b>5. DISKUZE A ZÁVĚR.....</b>	<b>62</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>65</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ .....</b>	<b>72</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>73</b>

## ABSTRAKT

Kardiovaskulární onemocnění představují celosvětově nejčastější příčinu úmrtí. Arytmie neboli poruchy srdečního rytmu k této mortalitě přispívají nemalou měrou.

Výzkum v oblasti morfologie převodního systému srdečního má více jak stoletou historii, ale oblast ontogeneze není ani v dnešní době dostatečně prozkoumána. Přitom pochopení mechanismů indukce pracovního myokardu ve specializovanou tkáň by mohl být jeden z klíčů k otevření dveří nových možností diagnostiky a terapie onemocnění v této oblasti.

Cílem této práce je pochopení vlivu mechanické zátěže na vznik a vývoj převodního systému srdečního. Chci prokázat, že mechanické zatížení srdce krevním oběhem hraje v embryonálním vývoji nezastupitelnou roli v diferenciaci převodního systému srdečního (PSS).

Jako model pozorování jsem si vybral kuřecí srdce. Při porovnání dat získaných na srdci ptáků a savců můžeme najít drobné odlišnosti v detailech, nicméně hlavní principy a mechanismy se zdají být stejné. Kuřecí embryo se vyvíjí 21 dní, přičemž toto časové údobí lze podle Hamburgera a Hamiltona rozdělit do 46 stádií. Zpočátku představuje srdce pouze primitivní trubici, která se stáčí v srdeční kličku. Posléze je přeměněna na zralý čtyřoddílový orgán charakteristický pro vyšší obratlovce. Tyto morfologické změny korelují i se změnami šíření vzruchu srdeční tkání.

Pokusné objekty jsem rozdělil do tří skupin - přirozeně se vyvíjející kuřecí srdce *in vivo*, jako kontrola, kterou jsem srovnával se srdci ponechanými bez mechanické zátěže a s mechanickou zátěží v kultivačním mediu po dobu 24 hodin.

Zaměřil jsem se především na monitoraci vedení akčního potenciálu po komoře pomocí vysokorychlostní CMOS kamery. Získané výsledky funkce PSS jsem podpořil též pozorováním morfologických změn pomocí konfokálního mikroskopu a imunohistochemických reakcí za použití protilátek MF-20 proti těžkým myosinovým řetězcům a anti  $\alpha$  - Aktininu pro průkaz  $\alpha$ -Aktininu.

Výsledky vypovídají o tom, že za specifických podmínek, kdy se srdce kuřecího embrya na 24 hodin odpojí od krevního oběhu (mechanické zátěže) a uchová v kultivačním mediu, nedochází k vyžívání PSS. Naopak

vzniká regrese ve vývoji směrem k nejprimitivnějšímu vedení akčního potenciálu od báze směrem k hrotu „base to apex“. Tyto výsledky korelují s regresí ve výstavbě trámců srdeční komory pozorovatelné konfokální mikroskopií. Imunohistochemické analýzy poukazují především na změnu orientace myofibril v oblasti výtokové části.

Necháme-li za stejných kultivačních podmínek srdce pod mechanickou zátěží v podobě nainjekovaného silikonového oleje, dochází k vyzrávání PSS srovnatelnému s vývojem in vivo.

Celkové výsledky napovídají tomu, že pro diferenciaci PSS je nutné mechanické natažení myocytů.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** PŘEVODNÍ SYSTÉM SRDEČNÍ, KUŘECÍ EMBRYO,  
OPTICKÉ MAPOVÁNÍ

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the most common cause of death in the world. They include abnormal heart rhythm, otherwise known as arrhythmias, which make a significant group of diseases contributing to the morbidity and mortality.

Research in the area of cardiac conduction system (CCS) morphology has over 100-year history, but the area of ontogeny has not yet been thoroughly explored. It is possible that understanding of the signaling mechanisms involved in the CCS development may be the key to opening doors to new possibilities of diagnosis and therapy of diseases in this area.

The goal of this research is to understand the influence of mechanical loading on the development of CCS. I would like to prove, that mechanical load on heart caused by blood circulation in embryonic development plays an essential role in differentiation of CCS.

For our research we chose the chicken heart. In comparing bird heart with mammal heart it is possible to find dissimilarities in details, nevertheless, the main principles and mechanisms appear to be the same. Chicken embryo develops for 21 days and it is possible to divide this period into 46 stages according to Hamburger & Hamilton. At first, the heart is only a primitive tube, which then loops and finally develops into a mature four-chamber organ specific for higher vertebrates. These morphological changes correlate with changes of spread the activation wave through heart tissues. The aim of this work should be the prove that without mechanical load from blood in cardiac chambers the CCS will not develop further normally.

We have compared three groups - chicken hearts, which had developed naturally *in vivo* and hearts with and without artificial mechanical loading in cultivation medium for a period of 24 hours. We focused on monitoring the spread of the activation wave through the ventricles by high-speed CMOS camera. We corroborated these results also by the study of morphological changes evaluated by confocal microscopy and by immunohistochemical methods using antibodies MF-20 against myosin heavy chains and anti  $\alpha$ -Actinin against  $\alpha$ -Actinin.



Ours results show that under specific conditions when we disconnect chicken embryo's heart from blood circulation (mechanical loading) for a period of 24 hours and leave it in cultivation medium, the CCS does not mature. On the contrary, development of the action potential degenerates to the most primitive form – from base to apex. These results correlated with the regression in development of the ventricle trabeculae, which was observable on confocal microscope.

Immunohistochemical analyses point mainly to trabecular disorganization and a change of the myofibril orientation in the outflow tract.

On the other hand, loading the ventricle with silicone oil that would cause mechanical stress, while maintaining the hearts under equal conditions, resulted in normal maturation of CSS comparable with in vivo ontogeny.

In conclusion, these results confirm the essential role of mechanical stretch of myocytes for differentiation of CSS.

**KEY WORDS:** CARDIAC CONDUCTION SYSTEM, CHICK EMBRYO,  
OPTICAL MAPPING

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1.Úvod

Kardiovaskulární onemocnění se řadí na špici v celosvětové mortalitě. Jen v roce 2004 byly příčinou 17.1 milionu úmrtí, což představuje 29% všech příčin smrti. (WHO, 2011). U obyvatel České republiky tvoří mortalita u kardiovaskulárních onemocnění ještě daleko větší podíl. Za rok 2009 to bylo 54 100 obyvatel z absolutního počtu 107 449 zemřelých, což představuje více jak polovinu všech příčin smrti. Tento počet se sice z dlouhodobého pohledu snižuje, nicméně jedná se pouze o mírný pokles (UZIS 2010; CZSO 2010; tabulka 1).

Počet úmrtí obyvatel ČR			
Rok	Celkem	Nemoci oběhové soustavy	Procentuální vyjádření (%)
1995	117 913	65 951	55,93
1996	112 782	63 145	55,99
1997	112 744	63 334	56,18
1998	109 527	60 397	55,14
1999	109 768	60 286	54,92
2000	109 001	58 192	53,39
2001	107 755	57 404	53,27
2002	108 243	57 152	52,80
2003	111 288	58 065	52,18
2004	107 177	55 042	51,36
2005	107 938	55 155	51,10
2006	104 441	52 560	50,33
2007	104 636	52 464	50,14
2008	104 948	52 280	49,82
2009	107 449	54 100	50,35

**Tabulka 1** Počet úmrtí obyvatel ČR na nemoci oběhové soustavy v letech 1995-2009

K hodnotě mortality přispívají nemalým podílem arytmie. Jedná se o poruchu rytmu způsobené postižením funkce převodního systému srdečního (PSS). Mohou vznikat na základě různých příčin - např. následkem

vrozených defektů, poruchami prokrvení u ischemických chorob srdečních, zánětem, vlivem farmakologické léčby aj. Patofyziologické mechanismy poruch srdečního rytmu lze charakterizovat jako poruchy tvorby či vedení vzruchu. Obecně situace, kdy není vyjádřen normální sinusový rytmus a normální srdeční frekvence nazýváme Arytmickým selhání (Fejfar et al., 2002). Udavatelem srdečního rytmu (pacemakerem) se za patologických stavů mohou stát i jiné úseky PSS než sinoatriální uzel nebo dokonce buňky síňového či komorového myokardu, u nichž došlo při poškození ke snížení klidového napětí (Štejfá et al., 2007; Barrett et al., 2010). Jedním z klíčů, které nám mohou odemknout dveře nových možností diagnostiky a terapie onemocnění v této oblasti, je co nejlepší pochopení morfologie, fyziologie a hlavně mechanismů indukce pracovního myokardu ve specializované tkáni PSS.

Výzkum na poli morfologie PSS má již více jak stoletou historii. U jejího zrodu stáli takoví velikáni jako J. E. Purkyně, S. Tawara, W. Einthoven, W. Ashoff, A. Keith, M. Flack a W. His (Suma et al., 2001). Naopak po stránce fylogeneze a ontogeneze zůstala tato problematika po dlouhou dobu zastřena rouškou spekulací a dohadů (Moorman et al., 1998). Teprve v posledních deseti letech se úsilí výzkumného zájmu soustředilo na porozumění buněčným a molekulárním mechanismům řídících vývoj PSS.

Dříve prosazovaný názor, že PSS pochází z nervové tkáně (Gorza et al., 1988), je již dnes jednoznačně vyvrácen a není pochyb o tom, že původ je myogenní (Gourdie et al., 1995; Cheng et al., 1999). Přesto zůstává otázka týkající se indukce a diferenciací pracovního myokardu ve specializovanou tkáň.

Jako signální molekula byl označen endothelin (ET). Podařilo se totiž prokázat, že při exogenním podávání ET docházelo k expresi markerů PSS v embryonálních kuřecích kardiomyocytech *in vitro* (Gourdie et al., 1998). Zároveň se podařilo prokázat, že při současné expresi lidského ET a hovězího endothelin-konvertujícího enzymu (ECE) dochází ke vzniku ektopicky lokalizovaných tkání PSS u kuřecích embryí *in vivo* (Takebayashi-Suzuki et al., 2000). Při hemodynamicky zvýšené expresi ECE docházelo

k dřívější diferenciaci komorového systému u kuřecího embrya (Reckova et al., 2003; Hall et al., 2004).

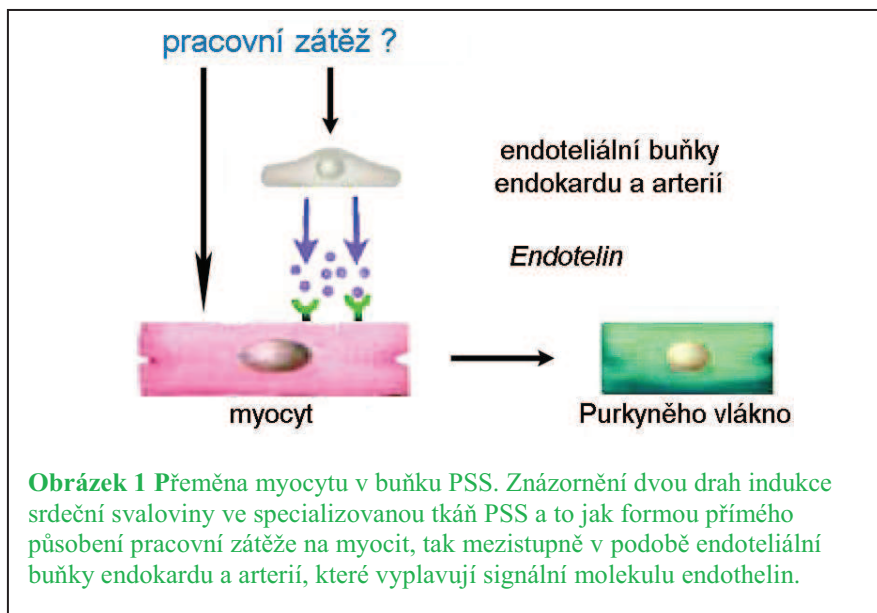
Podvázání konotrunků vedlo ke zvýšené tlakové zátěži a akceleraci růstu založené na proliferaci buněk. Výsledkem nebylo tedy pouze větší, standardně uspořádané srdce, ale docházelo i k významné přestavbě trabekulární architektury. Zjištění ukazuje na zrychlení morfogeneze. Došlo též k předčasnému objevení zralého typu funkce His-Pukynova systému vzhledem ke kontrolní tkáni. Zralý způsob aktivace se vyskytoval již na stádiu HH 27 (Hamburger & Hamilton, 1951), což koreluje zhruba s 5. embryonálním dnem (5.ED). To znamená 48 hodin po podvazu a o 2 dny dříve než u kontrol. Z této konverze, která byla urychlena zvýšením nároků na pracovní myokard komor, můžeme usuzovat, že tlak v komoře hraje ve vývoji PSS velmi významnou roli (Clark et al., 1989; Sedmera et al., 1999; Reckova et al., 2003; Hall et al., 2004).

Pro potvrzení hypotézy bylo provedeno několik pokusů ve snaze získat korespondující výsledky jiným postupem. Přistoupilo se k podvázání levé předsíně, čímž se jednoznačně snížily nároky na pracující myokard komor. Toto bylo spojeno s významně zpožděnou přeměnou ve vedení od hrotu k bázi. Na stádiích HH 3 a 36 (8. a 10.ED), kdy již běžně pozorujeme zralý typ vedení akčního potenciálu po komoře embryonálního srdce, díky vyzrálé funkci Tawarových ramének, byly srdce podrobené podvazu levé předsíně opožděny oproti kontrolám (Reckova et al., 2003). Tyto změny funkce PSS byly doprovázeny i změnami exprese conexinu 40, což je hlavní marker PSS (Hall et al., 2004; Sedmera, 2004).

V poslední době tedy převládá názor, že vlivem hemodynamických procesů (tedy tlakem) na endoteliální buňky endokradia a artérií způsobuje spouštění kaskády chemických procesů. Významnou roli v nich hraje endothelin jako signální molekula, která působením na myocyty způsobuje jejich diferenciaci ve specializovanou tkáň PSS (Gourdie et al., 2003; Reckova et al., 2003; Hall et al., 2004; Sedmera, 2004; Sankova et al., 2010, Obrázek 1).

Oproti předchozím *in vivo* modelům se v našem experimentu pokusíme odlišit střížné napětí na endotelu od strečinku myocytů, abychom dokázali, že diferenciace PSS, alespoň ta časná, může fungovat též na principu buněčné

autonomie. Přímo cestu embryonální přeměny buněk srdeční svaloviny ve specializovanou tkáň PSS naznačují i jiní autoři (Thompson et al., 2003).



Jednou z možností jak prokázat přítomnost obou mechanismů by mohl být experiment provedený na buněčné kultuře. Problémem by však byla následná aplikace výsledků z vývoje v buněčné kultuře na *in vivo* embryonální vývoj.

Bádání se nyní zaměřuje především na buněčnou a molekulární úroveň, nicméně tyto výsledky je potřeba zasadit do širšího kontextu. Proto se v mé práci budu zabývat vývojem PSS u kuřecího embrya jako celku. Zaměřím se především na vliv mechanických faktorů při indukci PSS u kuřecího zárodku *in vitro* v porovnání se stejnými stádii *in vivo*. K tomuto výzkumu mám možnost využít velice moderní a sofistikované metody optického mapování šíření akčního potenciálu v srdci pomocí vysokorychlostní CMOS kamery.

## 1.2.Funkční anatomie srdce

Srdce je jedním ze základních životně důležitých orgánů obratlovců včetně člověka. Jeho funkcí je zajišťovat nepřetržitou cirkulaci krve krevním oběhem,

což je nezbytné hned z několika důvodů. Především jde o transport živin potřebným orgánům, odvádění odpadních látek a produktů metabolické přeměny, udržování homeostázy a v neposlední řadě specifická i nespecifická obrana organismu proti cizorodým agens.

Už odpradáвна je považováno za nesmírně důležitý orgán - nejen centrum života, ale i citů a celkového charakteru jedince. Ve skutečnosti se jedná o dvě čerpadla, která jsou anatomicky i po funkční stránce spojena do energeticky výhodného komplexu. Tyto dvě části srdce jsou od sebe odděleny přepážkou - septem a síně od komor pomocí cípatých chlopní zabraňujících krevnímu návratu. Činnost srdce zajišťuje nepřetržitou cirkulaci krve krevním oběhem. To je nezbytné z několika důvodů, jako například transport živin potřebným orgánům, odvádění odpadních látek a produktů metabolické přeměny, udržování homeostázy a v neposlední řadě specifická i nespecifická obrana organismu proti cizorodým agens.

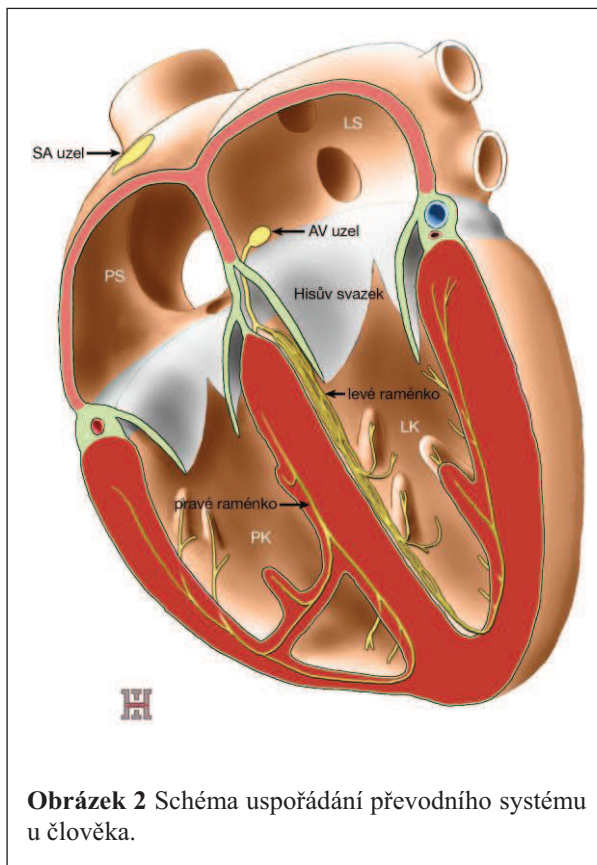
Svou nezastupitelnou úlohu může srdce správně provádět pouze v případě, že je dobře koordinováno. Jeho činnost je založena na rytmickém střídání systoly a diastoly. Nejprve dochází k systole síní a přesunu krve do komor. Poté následuje systola komor, kdy je krev vypuzována do aorty či plicní artérie. Posledním krokem je diastola všech oddílů. Podnět k tomuto rytmickému stahování dává PSS.

### **1.2.1. Funkční uspořádání PSS**

PSS můžeme rozdělit na několik částí: sinoatriální uzel, síňové meziuzlové dráhy, atrioventrikulární uzel, Hisův svazek, Tawarova raménka a Purkyňova vlákna (Obrázek 2).

U savců se vzruch generuje v místě sinoatriálního uzlu (Keith-Flackův uzel). Tento primární pacemaker (udavač rytmu) se nachází ve stěně pravé síně subendokardiálně u místa vstupu horní duté žíly. Má podobu malých kulovitých buněk nazývaných buňky P, nebo též buňky bledé. Vyznačují se absencí myofibril a interkalárních disků, také nexů mají velmi málo. Na druhou stranu jsou bohaté na glykogen. Odtud se akční potenciál šíří po pracovním myokardu předsíní až do

atrioventrikulárního uzlu (Aschoff-Tawarův uzel). Šíření vzruchu před síněmi neprobíhá isotropicky. Důvodem jsou překážky tvořené ústím velkých žil, které musí aktivace obejít. Dále pak hřebenité svaly (*musculi pectinati*), obzvláště prominující *crista terminalis*, ležící ve stropní klenbě a spojující obě tyto před síně. Ta je součástí jednoho ze tří popsaných internodálních traktů a skutečně tvoří rychleji a preferenčně vedoucí svazek (Triedman et al., 1997). Již nyní



**Obrázek 2** Schéma uspořádání převodního systému u člověka.

je využívána, zatím ne zcela komplexně prozkoumaná oblast internodálních traktů, v ablační léčbě některých síňových arytmií. Aktivační vlna šířící se přes pracovní myokard ze sinoatriálního uzlu dorazí k atrioventrikulárnímu uzlu, kde je výrazně zpomalena. Atrioventrikulární uzel je nepřesně ohraničená tkáň uložená též subendokardiálně v pravé před síni. Je charakteristická velmi pomalým vedením a taktéž dlouhou refrakterní periodou. Toto uspořádání má dva příznivé funkční důsledky. Jednak umožňuje dostatečné plnění, způsobené dlouhou prodlevou mezi systolou síní a komor, zároveň brání přenosu síňových tachyarií na komory, které by jinak mohlo končit s fatálními následky. Mezi síněmi a komorami je fibrózní tkáň, jež zde sehrává roli izolátoru, přes který se akční potenciál nemůže šířit. Vazivový srdeční skelet je penetrován Hisovým svazkem, po němž akční potenciál postupuje do Tawarových ramének. Ta směřují subendokardiálně po obou stranách septa směrem ke hrotu srdečnímu a dále se pak rozvětvují do Purkyňových vláken.

Na rozdíl od pracovního myokardu komory, který vede průměrnou rychlostí 0.4 m/s, vzruch v Hisově svazku a Tawarových raménkách se šíří rychlostí 2 m/s.



Skrze Purkyňova vlákna se vzruch šíří rychlostí 1m/s. Atrioventrikulární uzel, zodpovídá za časovou prodlevu mezi kontrakcí síní a komor. Vede pouze rychlostí 0.1 m/s. Sinoatriální uzel je generátorem vzruchu a vede rychlostí 0.04 m/s. Díky tomuto uspořádání rychle vedoucího komorového převodního systému se excitační i kontrakční vlna šíří od hrotu směrem k bázi, kde jsou lokalizovány velké cévy (Schneiber et al., 1998; Čihák et al., 2004; Trojan et al., 2003).

### 1.2.2. Princip vzniku a šíření akčního potenciálu

Srdeční svalovinu, potažmo její buňky, můžeme označit za vzrušivé elementy. Dostatečně intenzivní podráždění vyvolá elektrickou odpověď, kterou můžeme označit za akční potenciál. Veškeré vzrušivé tkáně mají společnou vlastnost, jde o depolarizaci a repolarizaci. Na jejím samotném počátku mluvíme o klidové polarizaci, neboli klidovém membránovém napětí. To je u srdeční tkáně  $-50$  až  $-90$  mV podle funkce buněk.

V buňkách PS prakticky nemůžeme mluvit o klidovém potenciálu, jelikož neustále probíhá spontánní pomalá změna membránového napětí - směrem ke spouštěcí úrovni. Obecně řečeno, pacemakerem srdce je centrum s nejrychlejší klidovou depolarizací. Klidový potenciál SA uzlu je cca.  $-50$  mV. Spouštěcí úroveň je již okolo hodnoty  $-45$  mV, proto je za normální okolností SA uzel srdečním pacemakerem.

Fáze depolarizace je poměrně rychlá. Její průběh trvá přibližně 1 až 3 ms a z hodnoty  $-90$  mV se dostává až na hodnotu kladnou okolo  $+20$  až  $+30$  mV. Podkladem pro tuto fázi je proud  $\text{Na}^+$  iontů dovnitř buňky z důvodu otevření  $\text{Na}^+$  kanálů. Membrána buňky se nevrací ihned na původní napětí, nýbrž setrvává v tzv. fázi plató, která je typická právě pro srdeční buňky. Je to z důvodu otevření  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů a proudu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Tohoto proudu se účastní i  $\text{Na}^+$  ionty, i když výrazně pomaleji, než-li ve fázi depolarizace. Třetí fází je repolarizace, způsobená uzavřením  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů a zvýšenou propustností membrány pro  $\text{K}^+$ , které proudí ven z buňky. Ve 2/3 procesu depolarizace je srdeční buňka zcela nedráždivá, tomuto jevu říkáme absolutní refrakterní perioda. Další podráždění lze vyvolat teprve při napětí membrány  $-40$  mV, a to podmětem nadprahovým. Mluvíme o



tzv. relativní refrakterní periodě. Tyto jevy přirozeně zabraňují vzniku arytmií (Schneiber et al., 1998; Barrett et al., 2010).

### 1.2.3. Elektricko-mechanická činnost srdce

Srdeční sval je tvořen speciálními svalovými vlákny, která se stahují na základě podráždění akčním potenciálem. Zprostředkovatelem převodu akčního potenciálu na mechanický stah jsou  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Při jejich nedostatku brání tropomyosin vzniku vazby mezi kontraktilními bílkovinami - aktinem a myosinem. Účinkem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů se zanoří tropomyosinová vlákna hlouběji do rýhy mezi aktinovými filamenti a odkryjí tak místa pro vytvoření vazby s hlavicemi myosinu. Výsledkem je ohnutí myosinové hlavičky a tím i kontrakce. Zde dochází ke štěpení potřebné energie ve formě ATP, proto jsou nesmírně důležité  $\text{Ca}^{2+}$  iontové kanály, které se uplatňují během fáze plató. Pokud by se  $\text{Ca}^{2+}$  ionty k myofibrilám nedostaly, sval by byl relaxován a při neodčerpání by se nacházel v neustálé kontrakci (Schneiber et al., 1998).

Povrch je kryt buněčnou membránou, která ohraničuje i konce výběžků a vytváří mezibuněčná rozhraní v podobě interkalárních disků. Ty jsou navzájem pevně spojeny (*tight junction*) nexy s nízkým elektrickým odporem (*gap junction*). Nejvíce těchto nexů je mezi koncovými výběžky, na rozdíl od bočních, kde se jich nachází relativně málo (Štejfá et al., 2007). V srdci savců můžeme rozlišit čtyři typy - connexin 30, 40, 43 a 45, jejichž výskyt se během vývoje mění. Connexin 40 zprostředkovává nejrychlejší vedení a nalézá se především v rychle vedoucím myokardu síní a dále pak v HS, TR a PV. Představuje dobrý marker i u ptáků, na jejichž model se zaměřuji ve své práci (Gourdie et al., 1993).

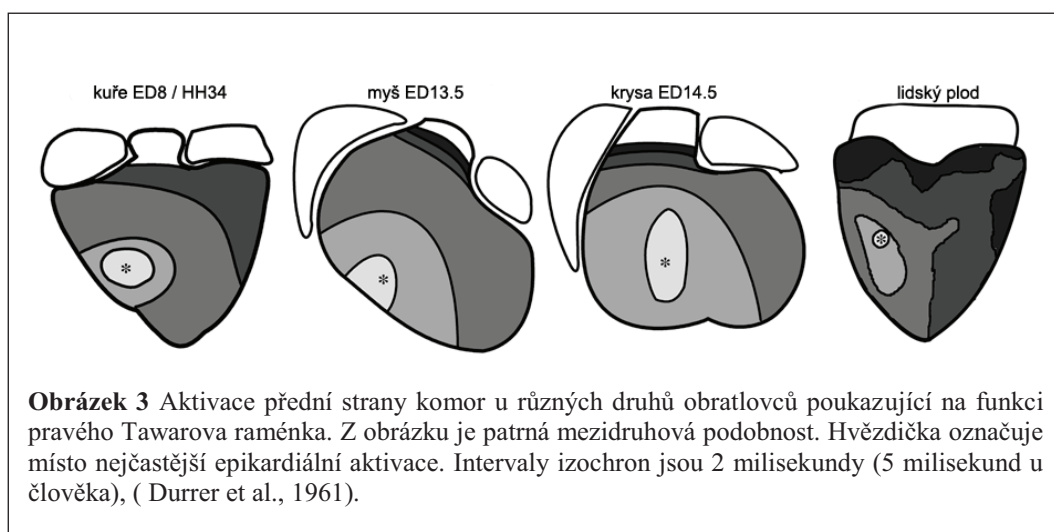
Kromě druhu a počtu mezibuněčných spojení určuje rychlost vedení i samotná geometrie svalových buněk. Obecně můžeme říci, že vzruch se rychleji šíří podél dlouhé osy než-li napříč. Tento jev byl prokázán též laboratorně na systémech buněčných kultur (Kucera et al., 1998).

#### **1.2.4. Řízení činnosti srdce**

I když srdce má svoji automacii, je pod neustálým vlivem vegetativního nervového systému. Sympatikus má na srdce vliv pozitivně chronotropní, tzn. zrychluje srdeční frekvenci. Pozitivně inotropní účinek zvyšuje sílu srdečního stahu, pozitivně dromotropní urychluje vedení vzruchu po srdeční tkáni a bathmotropní pozitivně ovlivňuje dráždivost. U parasympatiku je tomu přesně naopak, pouze s tím rozdílem, že negativní inotropie je nepřímá přes koronární vasokonstrikci. Frekvence, se kterou tepe srdce, může být ovlivněna také tlakem krve za pomoci baroreceptorů lokalizovaných na typických částech těla, jako například v oblouku aorty a karotických sinech. Tento mechanismus funguje opět přes nervový systém, potažmo díky útlumu sympatiku při zvýšeném dráždění receptoru, způsobeném zvýšeným tlakem (Schneiber et al., 1998).

### 1.3. Vývoj PSS u kuřecího modelu

Oproti nižším obratlovcům, kde se nachází pouze jednoduchá cirkulace, u ptáků a savců je již cirkulace dvojitá. Označujeme ji jako komplex velkého a malého krevního oběhu (Trojan et al., 2003). Často vyvstává otázka, do jaké míry lze data pořízená na srdci kuřecího modelu extrapolovat na srdce savců, potažmo člověka. Při porovnávání dat získaných na srdci ptáků a savců můžeme najít drobné odlišnosti v detailech, nicméně hlavní principy a mechanismy se zdají být stejné (Obrázek 3). U kuřecího srdce nalezneme stejně jako u srdce lidského rozdělení na 4 dutiny, po anatomické stránce též obdobný pacemaker, HS, TR, i PV (Sedmera et al., 2005). Mírně se liší anatomie koronárních cév a nacházíme zde jiný poměr tloušťky levé a pravé komory. U savců je to obecně 3:1, u ptáků 5:1. Příčinou je vyšší metabolismus, tělesná teplota a tím i vyšší tepová frekvence spojenou s nároky na levou komoru (Sedmera et al., 2007). Při optickém mapování myších zárodků bylo prokázáno, že se u nich vyskytuje, stejně jako u kuřecích embryí, pomalé vedení konotrunkem, časná a postupná specifikace a diferenciací jednotlivých komponent PSS (Sedmera et al., 2003a). Podobná srovnávací studie byla provedena i na krysích zárodcích, kde byla rovněž prokázána časová posloupnost vyžívání jednotlivých komponentů komorového PSS. Byla nalezena též přítomnost dočasné přední aktivační cesty, která se vyskytuje na kuřecím modelu (Sedmera et al., 2004).

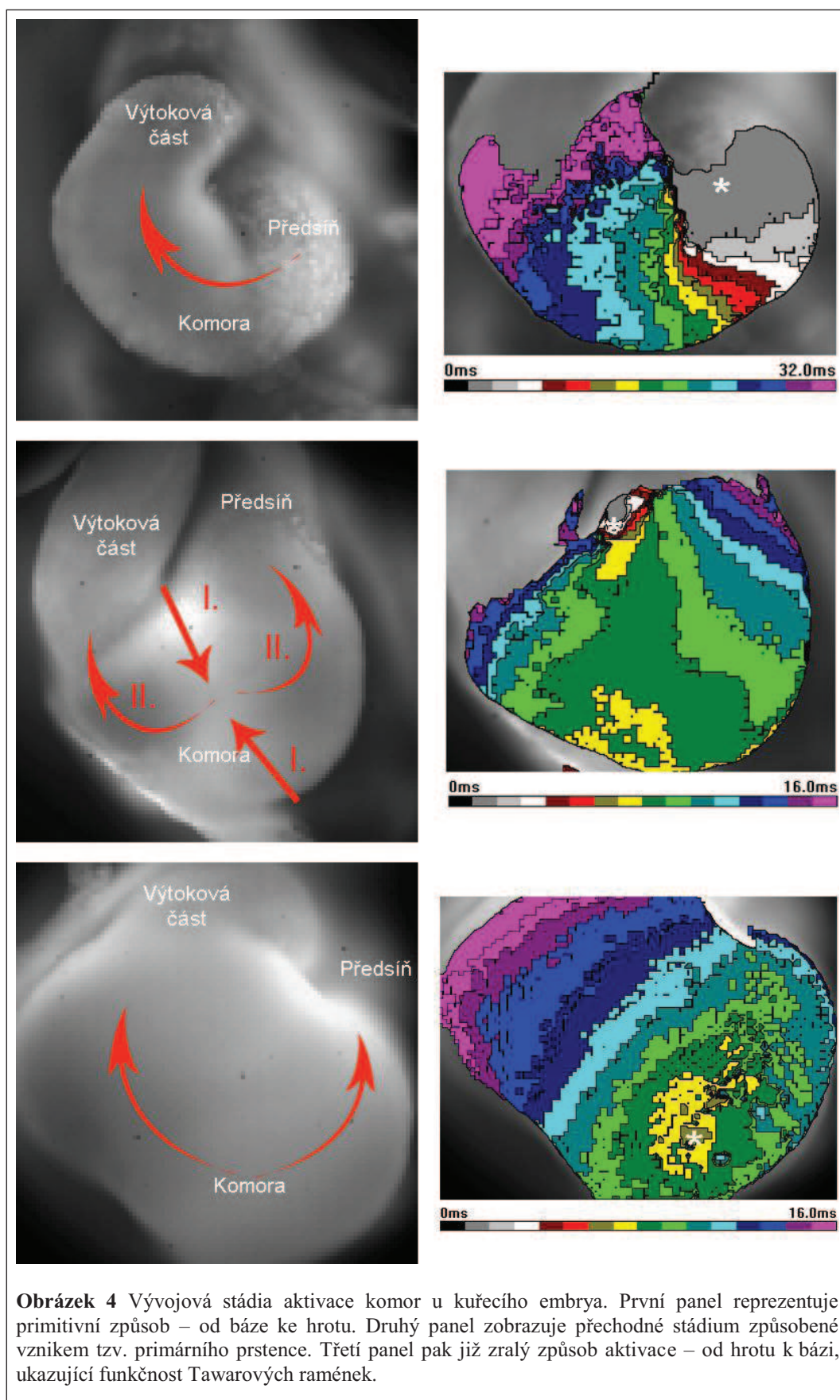


Kuřecí embryo se vyvíjí 21 dní a jeho vývoj lze rozdělit do 46 stádií dle klasifikace Hamburger & Hamilton (Hamburger & Hamilton, 1951). Jedná se o značně rozšířený a užívaný systém fyziologického vývoje kuřecího zárodku. Nespornou výhodou provádění výzkumu na kuřecích srdcích je i jejich pořizovací cena a jednoduchost inkubace.

Během ontogeneze prodělává kuřecí srdce složité morfologické změny. Na této přeměně se nemalou měrou podílí naprogramovaná buněčná smrt - apoptóza (Schaefer et al., 2004; Cheng et al., 2002). Zpočátku představuje srdce pouze primitivní trubice. Dalším vývojovým stupněm je stáčení této v srdeční kličku. Posledním krokem je septace a přeměněna srdeční kličky na zralý čtyřoddílový orgán charakteristický pro vyšší obratlovce. Tyto morfologické změny korelují i se změnami šíření vzruchu srdeční tkáně. Ve stádiu primitivní trubice se vzruch šíří pomalu a izotropicky. K jeho přenosu ještě není používán PSS, ale šíří se pomalou propagací z buňky na buňku (Kamino et al., 1991).

Vytváření srdeční kličky se odehrává ve stádiu HH 10 – 16, což koreluje přibližně s 2.ED. Klička obsahuje předsíň, komoru a výtokovou část, které se dále vyvíjejí v dospělý čtyřdutinový orgán. Na tomto stádiu srdeční kličky můžeme rozeznávat již rychle a pomalu vedoucí úseky (Arguello et al., 1986; Obrázek 4).

V následujících stádiích sehrávají velkou roli komorové trabekuly. Ty se vyznačují nejrychlejším vedením vzruchu (Reckova et al., 2003). První známku trabekulizace lze objevit již v HH 16 jako elipsovité jamky na vnitřní straně budoucího hrotu levé komory. Okolo HH 24 (4.-5.ED) se trabekulární síť vyskytuje již téměř úplně na obou komorových dutinách. Přibližně v HH 26 (5.ED) se začíná vytvářet mezikomorová přepážka (BEN-SHACHAR et al., 1985; Obrázek 4), zatímco k septaci předsíně dochází již kolem stádia HH 13 (2-3.ED) (Sedmera et al., 1998). Trabekuly v komoře tvoří mimo jiné též základ pro budoucí His-Purkyněho systém. Jakmile dojde k dokončení komorové septace, dochází i k definitivní vývojové etapě. Ta představuje aktivaci komor od hrotu směrem k bázi (Chuck et al., 1997, 2004; Sankova et al., 2010; Obrázek 4), (Machálek 2008).



## 2. CÍL PRÁCE

Naším hlavním cílem je dokázat, že bez mechanického zatížení, které je podmíněno krevním oběhem, se nebude PSS dále normálně vyvíjet. Toho chceme dosáhnout srovnáním tří pozorovaných skupin. Přirozeně se vyvíjející kuřecí srdce *in vivo*, srdce bez a s mechanickou zátěží v kultivačním médiu *in vitro* po dobu 24hodin. Budeme srovnávat vývoj *in vivo* a *in vitro* ze dvou hledisek. Nejprve po funkční stránce, měřením akčního potenciálu, jež se šíří po srdeční tkáni. K tomu využijeme vysokorychlostní CMOS kameru. Následně vyšetříme srdce po stránce morfologické - pomocí sekvence virtuálních řezů na konfokálním mikroskopu a provedením imunohistochemických reakcí.

### 2.1. Inkubace 24hodin ze 3. na 4. den

Kuřecí srdce, stejně jako srdce jiných obratlovců včetně člověka, prochází během embryonálního vývoje neustálými změnami, které jsou charakteristické pro různá časová období. Základní diferenciací, týkající se změny šíření elektrického potenciálu po srdci kuřecího embrya (podpořené změnami morfologickými) je právě mezi 3. a 4. dnem. V tomto období dochází u většiny srdcí kuřecího zárodku k přeměně šíření akčního potenciálu. Z původně zcela primitivního, kopírujícího srdeční kličku - tzv. šíření od báze k hrotu, na šíření od vznikajícího primárního prstence směrem k vyvíjející se komoře - tzv. šíření primárního prstence. Chceme zde dokázat, že kuřecí srdce, která budou na 24hodin bez mechanického zatížení a přitom jim budou ponechány podmínky k růstu, se oproti srdcím, která jsou zatížena přirozeným krevním oběhem, opozdí ve vývoji.

### 2.2. Inkubace 24hodin ze 4. na 5. den

Stejně tak ze 4. na 5. den dochází ke změně v šíření akčního potenciálu po srdeční tkáni kuřecího zárodku a to díky neustále se vyvíjejícímu a morfologicky dokonaleji uspořádanému srdci. Jedná se o přechod ze šíření primárního prstence

na již dokonalý způsob vedení od hrotu směrem k bázi. Tato změna poukazuje na vyžívání funkce Tawarových ramének. Zde bychom chtěli opět potvrdit naši hypotézu, že v srdci, které není zatíženo mechanickou činností, nedochází k žádnému nebo pouze pomalému vývoji, a to jak po stránce funkční, tak samozřejmě i morfologické.



## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Materiály a přístroje

#### 3.1.1. Chemikálie

<u>Název</u>	<u>výrobce/dodavatel</u>
Anti- $\alpha$ aktinin antibody	Sigma
Benzen	Lach-Ner
Bioclear	Bio optica
BSA	Sigma
Cytochalasin D	Sigma
Di-4-ANNEPPS	Invitrogen
DBSK	Sigma
DEPEX	VWR international
Eosin	Sigma
Ethanol	Lachema
GaM TRITC	Jackson imuno research
GaM Rhodamine Red	Jackson imuno research
Hematoxylin	Sigma
Hoechst	Sigma
ITS	Sigma
KCl	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
Kuřecí sérum	vlastní výroba
M199	Sigma
MF20	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Methanol	Lachema
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
NaCl	Sigma
Normal Goat serum	Jackson imuno research
Parafin	McCormick



Paraformaldehyd	Lach-Ner
Poly-L-lysine	Sigma
Xylen	Lach-Ner
Silikon	VŠCHT

### 3.1.2. Roztoky a pufry

<u>Název</u>	<u>množství/poměr</u>
<b>PBS (20x) - zásobní roztok pufru</b>	
NaCl	2,74 M
KCl	0,5 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,35 M
<b>Dents – fixační roztok</b>	
CH <sub>3</sub> OH (methanol)	80%
DMSO(dimetylsulfoxid)	20%
<b>Kultivační médium</b>	
DMEM : kuřecí sérum	50:1
(DMEM +kuřecí sérum) : ITS	1000:1

### 3.1.3. Přístrojové vybavení

<u>Název</u>	<u>výrobce/dodavatel</u>
Autokláv	Varioklav
CMOS kamera Ultima L	MiCAM Ultima
Centrifuga	Roth
Inkubátory	Gallenkamp
Instrumentárium	Moria, Dumont
Konfokální mikroskop SPE	Leica microsystems
Kyslíková bomba	Linde
Míchačka	IKA Labortechnik

Mikrobiální filtr	Milipore
Mikroskop BX51WI pro CMOS kameru	Olympus
Mikrotom	Leica microsystems
Mrazicí boxy	Liebherr
pH metr	Jenway, pH Metr 3310
Pipety	Nichiryo, Eppendorf
Preparační mikroskop	Olympus SZX12
Preparační mikroskop	Olympus SZH10
Rotátor	Stuart rotator SB3
Rotátor houpačka	Duomax 1030
Svařovací přístroj	Euroseal 2001 plus
Ultrazvuková čistička instrumentária	DVC
Váhy	Scout
Váhy analytické	A & D Instruments
Vyhřívací ploténka	Linkam MC 60
Zdroj studeného světla	Olympus KL 1500 LSD

#### **3.1.4. Softwarové vybavení**

<u>Název</u>	<u>výrobce/dodavatel</u>
Operační systém Windows 7 Professional	Microsoft
Adobe Photoshop 9.0. CS2	Adobe
BrainVision Analyzer	BrainVision
MiCAM ULTIMA acquisition software Ultima	BrainVision
Microsoft Office Word 2010	Microsoft
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft
Microsoft Office Powerpoint 2010	Microsoft
Microsoft Office Picture Manager 2010	Microsoft
Program pro konfokální mikroskop - LAS AF	Leica microsystems

## **3.2. Metody**

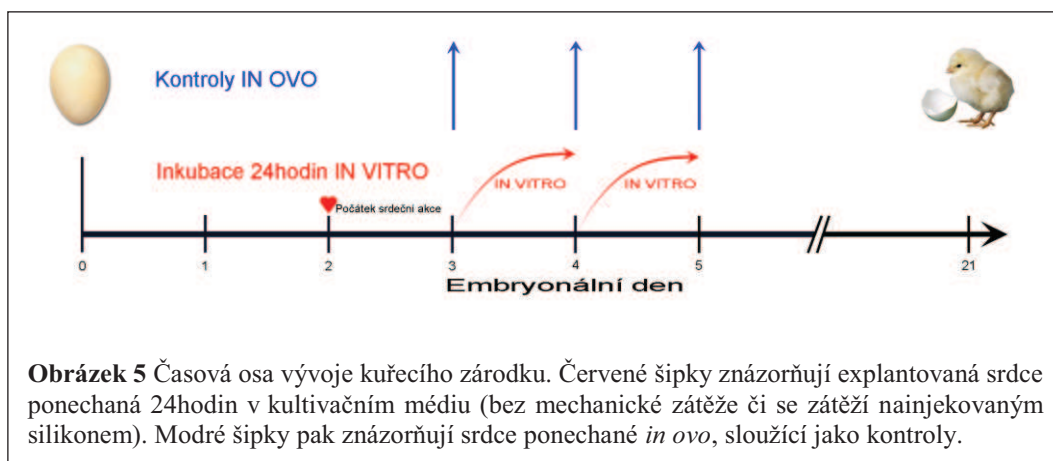
### **3.2.1. Inkubace vajec**

Pro náš experiment jsme využili oplodněná slepičí vejce rodu *white leghorn*, která byla pořízena v Institutu molekulární genetiky Akademie věd České republiky.

Na samém počátku experimentu je nutné si dobře rozvrhnout časové možnosti, jelikož po nasazení vajec do termostatu již není možné experiment odložit. Po přechodnou dobu, před samotným nasazením do inkubátoru, byla vejce skladována při teplotě 16°C. Před umístěním oplozených vajec do inkubátoru, musí být toto zařízení řádně očištěno a dezinfikováno (70% ethanol), poněvadž ve vlhkém prostředí dochází velmi snadno k rychlému růstu plísní. Ty by mohly porůst inkubovaná vejce a zahubit tak vyvíjející se kuřecí zárodek. Je-li inkubátor připraven a dorazila-li oplozená vejce, která jsou též očištěna dezinfekčním prostředkem (70% ethanol), nastavíme na inkubátoru parametry vhodné pro ideální vývoj a vejce nasadíme. Tento okamžik je klíčový z hlediska určování vývojového stádia kuřecího zárodku, proto jej přesně zaznamenáme do protokolu. V termostatu jsou vejce uložena oblým vrcholem vzhůru a inkubována při teplotě 37,5° - 38°C. Složení plynů je stejné jako ve vzduchu atmosférickém. Součástí termostatu je zvlhčovač, který udržuje vlhkost prostředí okolo 60 – 70 %. Tyto podmínky ideálně simulují přirozené prostředí pro vývoj kuřecího zárodku.

### **3.2.2. Explantace**

Pro náš experiment potřebujeme kuřecí embrya ze 3., 4., a 5.ED, proto celkový soubor vajec dělíme na tři části. Vejce určená k explantaci pro 3. a 4.ED dále rozdělujeme na tři skupiny. První dvě použijeme pro inkubaci ve vhodném kultivačním médiu na 24 hodin a to se zátěží silikonovým olejem a bez zátěže, třetí nám poslouží jako kontrola normálního přirozeného vývoje. 5.ED explantujeme srdce kuřecích zárodků pouze za účelem měření kontrolních vzorků (Obrázek 5).



Embrya, určená pro 24 hodinovou kultivaci v kultivačním médiu, je zapotřebí udržovat ve sterilním prostředí. Důvodem je vystavení mimo svou přirozenou ochranu, kterou jim poskytuje vaječná skořápka. Hrozí jim totiž infikování patogenním agens, které by je mohlo zahubit. Celá explantace se provádí v laminárním boxu, kde je sterilní prostředí zajištěno předchozím ošetřením pracovní plochy 70% ethanolem, ozářením UV světlem po dobu 20 minut a laminárním prouděním vzduchu přes HEPA filtr. Po dezinfekci skořápky 70% ethanolem přistupujeme k jejímu otevření a prohlédnutí kuřecího zárodku pod disekčním mikroskopem, abychom se přesvědčili o správném stádiu dle stupnice HH. Je-li embryo v požadovaném stádiu, opatrně jej vyjmeme z vejce pomocí sterilních nástrojů a vložíme do DBSK pufru. Ten je v Petriho miskách, které jsou také sterilní. V případě, že by embryo nebylo ještě dostatečně vyvinuté, je možné otvor přelepit průhlednou páskou a opět vložit do inkubátoru, kde se bude dále přirozeně vyvíjet. Pod disekčním mikroskopem izolujeme za sterilních podmínek bijící srdce společně s přiléhající zadní hrudní stěnou od zbytku těla. Velmi důležité je citlivé otevření přední hrudní stěny a tím obnažení srdce. Je to z důvodu, abychom později dosáhli dobrého prosycení srdeční tkáně barvivem citlivým na napětí a dosáhli tak kvalitního signálu potřebného k analýze. Takto je tkáň první skupiny srdcí připravena pro kultivaci ve vhodně zvoleném kultivačním médiu.

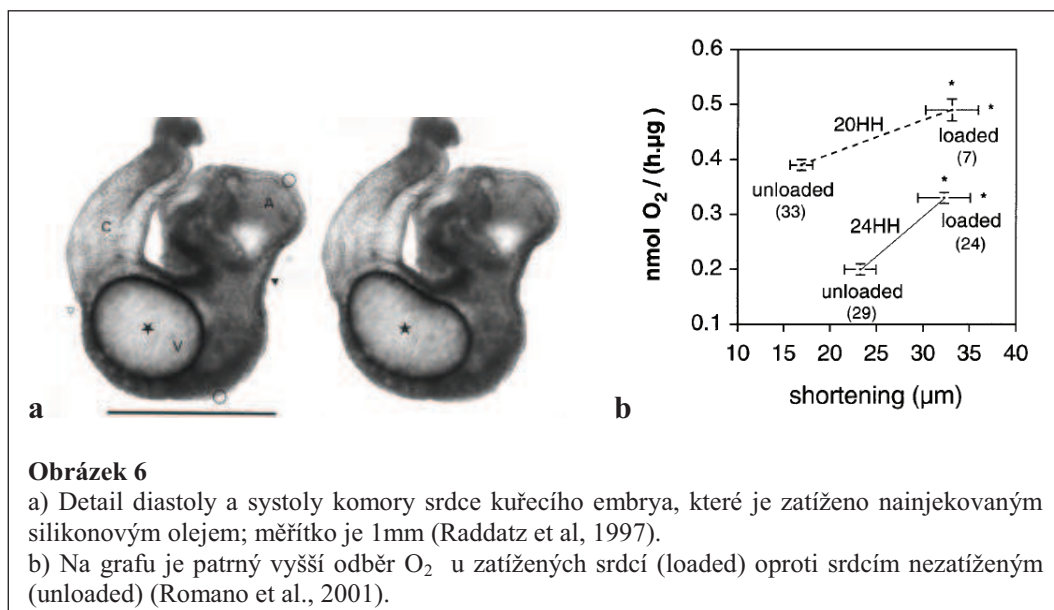
U druhé skupiny bijících srdcí kuřecích zárodků postupujeme obdobně jako u skupiny první. Jediným rozdílem je, že tyto srdce mechanicky zatížíme. A to na požadovaném stádiu HH před kultivací ve vhodném kultivačním médiu.

Třetí část vajec, která nám slouží jako kontrola, není potřeba explantovat za přísně sterilních podmínek. Ihned po explantaci jsou tkáně vystaveny optickému mapování, takže nehrozí znehodnocení infekčním agens. Explantaci tedy není třeba provádět ve vysvíceném laminárním boxu sterilními nástroji, ale postup práce je obdobný tomu u zárodků připravovaných pro kultivaci v kultivačním médiu.

### **3.2.3. Mechanické zatížení silikonovým olejem**

V rámci své bakalářské práce jsem porovnával výsledky pouze dvou skupin srdcí kuřecích zárodků, vyvíjejících se *in vivo* a kultivovaných *in vitro*. Zjistil jsem, že se PSS u srdcí ponechaných v kultivačním médiu opoždí ve vývoji oproti srdcím, která se vyvíjí přirozeně v *in vitro* podmínkách. Tento efekt jsem přisuzoval absenci mechanické zátěže, protože u srdcí vyvíjejících se v *in vitro* podmínkách nedocházelo k cirkulaci krve z důvodu odpojení od oběhu (Machálek, 2008). Abych prokázal, že za toto opoždění ve vývoji PSS je opravdu zodpovědná mechanická zátěž a ne jiný faktor, jako například artefakt způsobený samotnou orgánovou kulturou, rozhodl jsem se část srdcí zatížit mechanickou prací.

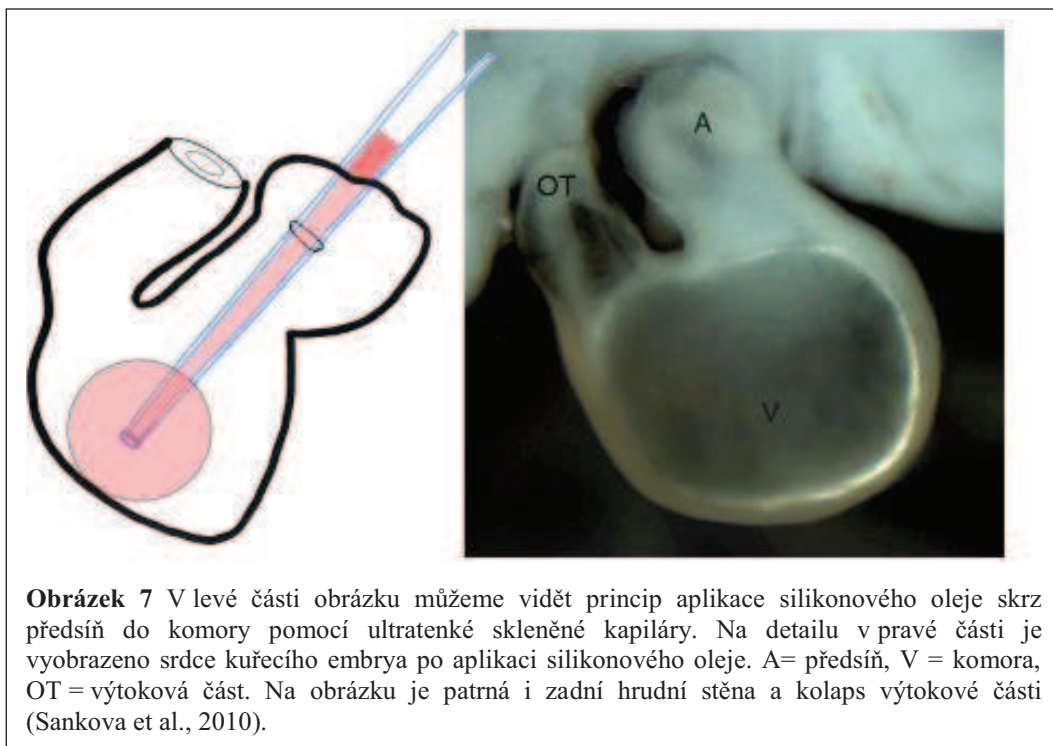
V odborné literatuře se můžeme setkat s prací kolegů ze Švýcarska. Ti využili embryonálních kuřecích srdcí, zatížených netoxickým silikonovým olejem jako *in vitro* model, pro sledování reakce na hypoxii a reoxygenaci (Raddatz, et al., 1997; Obrázek 6a). Výzkumem bylo zjištěno, že při mechanickém zatížení komory kuřecích zárodků nainjekovaným silikonovým olejem, dochází ke zvýšení komorové kontraktility podle Frank-Starlingova zákona. To korelovalo také se zvýšeným odběrem kyslíku a to až o 62% oproti kontrolám. Sledovaná srdce tedy objektivně pracovala s větším úsilím než kontroly, které byly ponechány ve stejných podmínkách *in vitro* kultivace, ale bez jakékoliv zátěže (Romano et al., 2001; Obrázek 6b).



Tato část experimentu je manuálně velmi náročná. Zatížení silikonem provádíme tak, že do srdeční komory zárodků, vstupem z předsíně, zavedeme speciální set zakončený taženou skleněnou kapilárou. Tímto setem injektujeme silikonový olej vhodné viskozity. Celý experiment provádíme pod mikroskopickou kontrolou a ve sterilních podmínkách laminárního boxu.

Výběr ideální viskozity byl prováděn empiricky. Na žádost jsme pro náš experiment obdrželi variaci netoxických silikonových olejů o různé viskozitě připravených na půdě Vysoké školy chemicko-technologické. Z těchto silikonových olejů jsme zvolili takový, jež při mechanické práci srdce nebyl silou stahu komory vypuzen ven přes výtokovou část, ale zůstal po celou dobu experimentu uvnitř komory.

Množství silikonového oleje koresponduje s maximálním objemem na konci diastoly. Objem jsme volili vždy větší než je toto maximum a residuum bylo vypuzeno rozšířenou předsíní či výtokovou částí. Srdce pak vykonávalo stahy svaloviny srdeční komory proti mechanické zátěži v podobě kapky silikonového oleje (Sankova et al., 2010); Obrázek 7).



### 3.2.4. Kultivace explantovaných srdcí

Tkáň, představující srdce se zadní hrudní stěnou, je přemístěna do předem připraveného kultivačního média. Toto růstové médium musí být sterilní a při jeho přípravě přesně dodržujeme postup a koncentraci jednotlivých složek.

Kultivační médium, které používáme je DMEM se sérem z kuřecího embrya a insulin-transferin-selenium médiem (ITS). Do roztoku je přidáno kuřecí sérum v poměru 1:50 a ITS 1:1000 (viz. 3.1.2. Roztoky a pufry; Thompson et al., 2003).

Samotná příprava média probíhá opět za přísně sterilních podmínek v dezinfikovaném boxu s laminárním prouděním a předchozím ozáření UV lampou. Sterilní jsou též špičky na pipetování a samotná čtyřnadvacetijamková destička, do které pipetujeme po jednom mililitru kultivačního média a vkládáme opatrně po jednom srdci.

Takto připravená srdce ponecháváme 24hodin v termostatu, v němž jsou nastaveny parametry ideální pro dané kultivační médium:

- 37°C při atmosférickém složení vzduchu s přidavkem 5% CO<sub>2</sub>

### 3.2.5. Optické mapování vysokorychlostní digitální kamerou

Srdce je elektricky vzrušivý orgán. Pro vyšetření jeho funkce se dnes již rutinně v klinické praxi používá EKG (elektrokardiograf). Ten využívá známého jevu, že elektrická aktivita srdce se projeví změnami elektrického napětí i na povrchu těla. Elektrická aktivita se dá měřit i systémem přímých elektrod, které jsou kladeny přímo na srdce. Chceme-li studovat tento orgán jako celek, je výhodné mít elektrod co možná největší množství. To samozřejmě naráží na problém, kterým je omezená velikost srdce, zvláště pak vyvíjející se srdce kuřecího embrya, jehož rozměry jsou v řádu milimetrů.

Pro tyto účely se podařilo vyvinout novou techniku. Díky ní jsme schopni sledovat šíření elektrické aktivity i na takto malém preparátu. Jedná se o techniku nazývanou optické mapování, která využívá virtuálních elektrod.

Bádání v této oblasti bylo zprvu prováděno pouze pomocí unipolárních elektrod (Arguello et al., 1986). Následovaly první pokusy využívající k optickému mapování pole fotodiod, které bylo vyrobeno na zakázku (Kamino et al., 1991). Nyní se k optickému mapování využívá vysokorychlostní digitální kamera se zabudovaným CCD nebo CMOS senzorem (Morley et al., 2001; Sedmera et al., 2005, Machálek 2008).

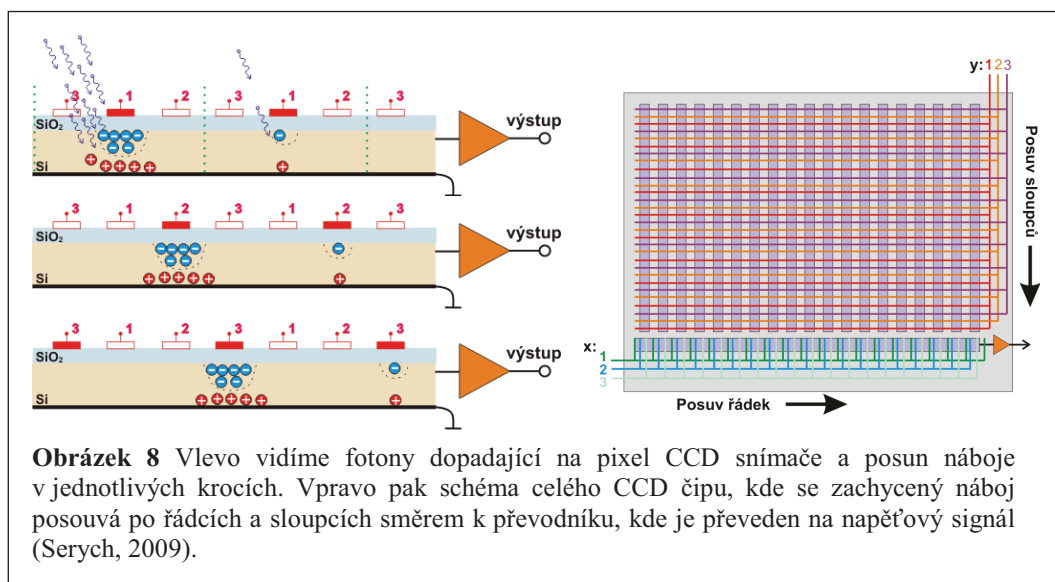
#### ***Princip funkce CCD a CMOS senzoru***

V dnešní době se CCD a CMOS obrazové snímače rozšířily natolik, že je můžeme nalézt prakticky ve všech aplikacích zpracování obrazu, proto bych se rád krátce zmínil o jejich principu.

V obou případech se jedná o polovodičové součástky. U CCD senzoru světlo, které dopadne na povrch křemíkové destičky v podobě fotonů, je ukládáno jako náboj v potenciálových jamkách. Ty zabraňují volnému pohybu elektronů a tím i náboje po čipu a dochází tak k jeho kumulaci. Každá taková potenciálová jáma představuje jeden pixel snímače. Velikost zachyceného náboje je ovlivňována především intenzitou dopadajícího světla a dobou, po kterou necháme čip světlu vystavený.



Takto zachycený náboj je nutné po určité době odebrat a převést na elektrický signál, jinak by mohlo dojít k přetečení potenciálové jámy. Obrazové CCD snímače obsahují matici pixelů (potenciálových jam), u nichž postupným přesouváním náboje z jedné jámy do vedlejší, dochází k jeho vysouvání na okraj čipu, kde je převáděn převodníkem na napěťový signál (Obrázek 8).



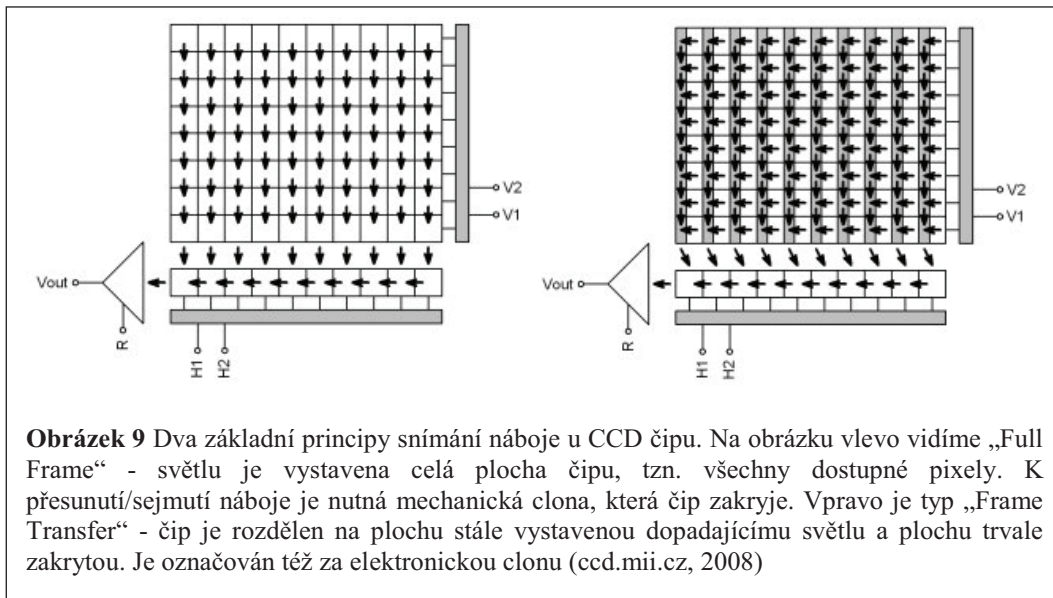
Praktický problém je ten, že se během tohoto přesunu jednotlivých řádků nesmí snímat obraz. CCD čip by tedy měl být zacloněn, aby nedocházelo k ovlivňování náboje. V podstatě existují tři hlavní řešení:

„Full Frame“ - vystavena světlu je celá plocha čipu, tzn. všechny dostupné pixely. K přesunutí/sejmutí náboje je nutná mechanická clona, která čip zakryje (Obrázek 9).

Druhou možností je „Frame Transfer“ - čip je rozdělen na plochu stále vystavenou dopadajícímu světlu a plochu trvale zakrytou. Do této plochy se v daný okamžik rychle přehraje celá snímací matice a z ní je již možné náboj klidně pomalu digitalizovat po celou dobu snímání dalšího obrázku na snímací části čipu (cca desítky ms). Funguje zde tedy paralelizmus. Princip se také označuje jako elektronická clona. Patří sice mezi nejlevnější, ale kvalitativně horší řešení (Obrázek 9).

Třetí variantou je „Interline Transfer“. Princip je podobný Frame Transfer. Také v tomto případě jde o elektronickou clonu, ale jinak provedenou.

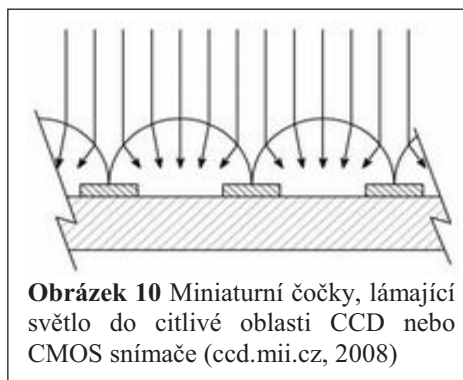
Vedle každého na světlo citlivého sloupce je i podobný zakrytý a na světlo necitlivý sloupec, který udržuje a posouvá náboj pro převod na signál během již dalšího snímání obrázku.



CMOS čip je po konstrukční stránce velmi složitý, ale vzhledem k tomu, že se vyrábí stejným způsobem jako procesory pro počítače, bývá obvykle levnější. Obvody, které digitalizují obraz u CCD čipu pro všechny pixely postupně, jsou zde integrovány již přímo v čipu jako součást každé světločivé buňky. Převod se tak děje separátně v každém okamžiku. Náboj se nepřesouvá po sběrnici, ale čte se neustále. Vývod dat obsahuje každá světločivná buňka zvlášť (miliony vývodů). To snižuje dobu nutnou pro přečtení obrazu z CMOS čipu. Tato vlastnost je žádoucí zejména při sériovém snímání. Naše kamera MiCAM ULTIMA L dosahuje rychlosti až 0.1ms na snímek při rozlišení 100x100 bodů, což by CCD kamera nebyla schopna. Nevýhodou je, že oblast citlivá na dopadající fotony představuje jen malou část každé buňky, zbytek tvoří právě digitalizační obvody.

Aby se co nejvíce zabránilo ztrátám v detekci světla způsobené neregistrováním fotonů dopadajících na místa mimo citlivou oblast, implantují se na povrch snímačů miniaturní čočky. Ty lámou světlo a směřují ho jen do citlivé oblasti (Obrázek 10).

Uvedené principy beze zbytku platí pro monochromatické, dá se říci černobílé snímáče. V dnešním světě ve většině případů potřebujeme snímat obraz barevně. Proto je nutné snímáče doplnit o barevné filtry, které propustí jen konkrétní část vlnových délek.



**Obrázek 10** Miniaturní čočky, lámající světlo do citlivé oblasti CCD nebo CMOS snímáče (ccd.mii.cz, 2008)

V praxi se využívá tradičního rozložení spektra do tří základních barev, z nichž lze zpětně složit původní barevný obraz. V současnosti se v tomto směru využívá dvou komplementárních trojic:

„RGB“ (Red, Green, Blue) - tzv. rozložení barevného viditelného spektra světla do složek červená, zelená, modrá. Tato tradiční kombinace však má nevýhodu ve filtru, kde každá barva pokrývá jen asi 1/3 spektra, tzn. jen 1/3 energie světla může projít. Výhoda spočívá naopak v jednoduché výrobě a perfektním barevném podání opět složeného obrazu.

„CMY“ - (Cyan, Magenta, Yellow) - tzv. rozložení barevného viditelného spektra světla do složek azurová, purpurová, žlutá. Výhodou tohoto principu je schopnost každého filtru pokrýt až 2/3 spektra. Je tu však velká nevýhoda v podobě problémů se správným vyrobením filtru Magenta, což způsobuje nepřesnosti v barevném podání. Proto se tato kombinace barev zatím využívá jen u levnějších zařízení a výrobce často CMY kombinaci doplňují o další filtry Green (zelená) pro odstranění zmíněných problémů.

Z pohledu principu snímání jednotlivých 3 složek barev se prakticky využívá 2 principů:

1. Použití tří separátních filtrů na třech nezávislých snímáčích (používá se v kvalitních kamerách) nebo tří filtrů na mechanickém karuselu před jedním monochromatickým CCD či CMOS snímáčem (vědecké kamery).

2. Přímo na snímáč je implementován trojbarevný filtr, v podobě střídání sloupců pixelů pro jednotlivé barvy nebo "barevné" pixely, rozložený dle Bayerovy masky. Zde se využívá vlastnosti lidského oka, které je více citlivé na jas než barevné podání. Uplatní se především ve fotoaparátech a levných kamerách (Březina 2001; Dvořák 2003; SCIMEDIA 2005, Machálek 2008).

## ***Zdroj světla***

Pro získání dobrého signálu je důležitý též kvalitní a dostatečně výkonný zdroj světla. Základní parametry, které u zdroje světla sledujeme, je intenzita vyzařovaného světelného toku, spektrální vyzařovací charakteristika a též stabilita. Mezi nejčastěji používané zdroje světla, které se používají pro optické mapování, řadíme laser, halogenovou žárovku rtuťovou, smíšenou či xenonovou výbojku, a světlo emitující diodu (LED).

**Laser** se vyznačuje vysokou koherencí a chromatičností světelného svazku, které dovoluje soustředit energii na reálně malé ploše. Z důvodu malé šířky světelného svazku, je laser vhodný pro jednobodové měření. Nejčastěji používaný argonový laser pracuje na vlnových délkách 473 nm a 488 nm což je v blízkosti excitačního maxima nejčastěji používaného barviva di-4-ANEPPS (480 nm). Výkon takového laseru se pohybuje nejčastěji mezi 5 až 20 mW.

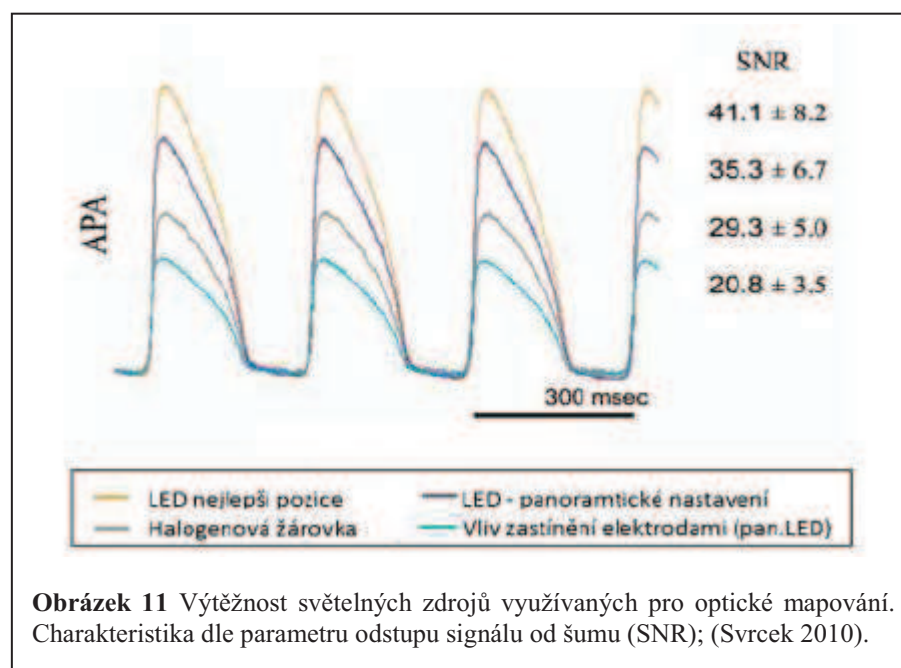
**Halogenová žárovka** je na tom svou účinností sice lépe nežli klasická wolframová žárovka, ale stále patří mezi energeticky náročná zařízení s vysokým příkonem v rozmezí 150-400 W a s tím i souvisejícím zahříváním. Proto je třeba řešit teplotní stabilizaci za účelem minimalizace šumu a stability vyzařovaného světelného toku. Vzhledem k širokému emisnímu spektru je třeba použití emisních filtrů. Vlnová délka se volí dle absorpčního maxima daného napětově citlivého barviva.

**Výbojky (Rtuťová, Smíšená, Xenonová)** jsou ve svém konstrukčním principu uzavřené trubice, naplněné směsí různých par a plynů. Využívají se především z důvodu nízkého kolísání intenzity a poměrně vysokého jmenovitého výkonu (průměrně 75 – 150 W). Dělí se právě podle použitého plynu. Xenonová výbojka nabízí, oproti výbojce rtuťové, nižší fluktuanci intenzity a spojitě spektrum oproti dosti čárovému spektru v případě rtuťové výbojky. Vzhledem k dosti širokému absorpčnímu peaku di-4-ANEPPS, jsme zvolili pro náš experiment právě xenonovou výbojku.

**LED diody** jsou v poslední době velmi oblíbeným zdrojem světla. Důvodem jsou jejich vlastnosti, ke kterým patří vysoká účinnost, stabilita vyzařovaného spektra, nízký šum a v neposlední řadě také příznivá cena. Nejčastěji se využívají zelené o vlnové délce 530 nm, či modré o vlnové délce

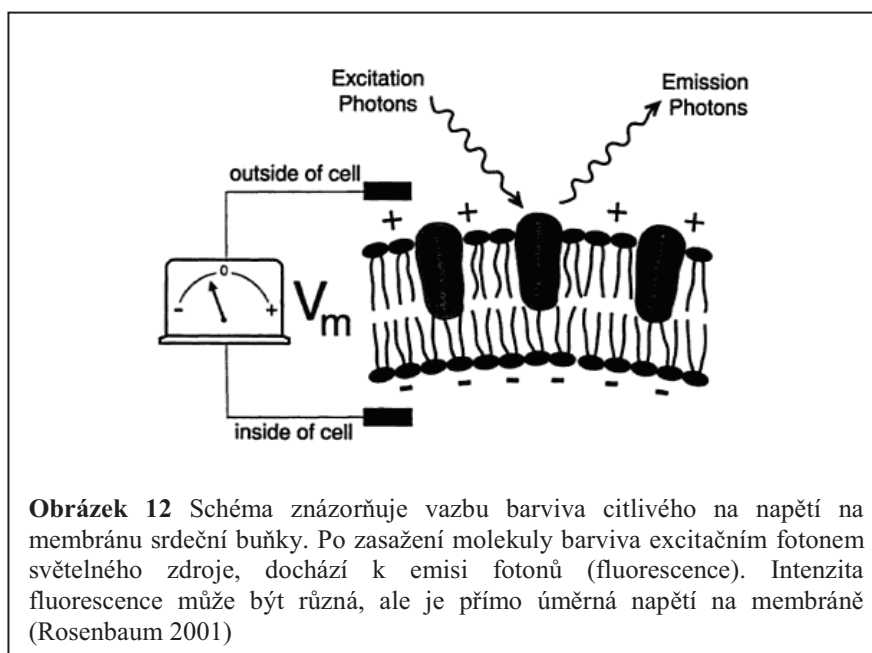
470 nm. Pro dosažení rovnoměrného osvětlení je možné využít též LED pole. Jmenovitý výkon je řádově v jednotkách wattů (5-10 W).

Níže na schématu můžeme vidět srovnání světelných zdrojů v kontrastu s konečnou kvalitou signálu, která je dána odstupem signálu od šumu (SNR – signal-to-noise ratio). Lze zde vypožorovat, že využití LED pole, jak při plošném, tak panoramatickém měření, má lepší parametry než-li halogenový světelný zdroj (Obrázek 11).



### ***Značení barvivem citlivým na napětí***

Optické mapování využívá techniku virtuálních elektrod. Důvodem jsou miniaturní rozměry sledovaného vzorku. V našem případě, kdy zaznamenáváme aktivační vlnu, která se šíří po komoře srdeční u kuřecího embrya, jsou rozměry v řádech  $\mu\text{m}$  až  $\text{mm}$ . Tkáň, kterou chceme podrobit optickému mapování, je potažena barvivem schopným reagovat na změny membránového napětí, změnou intenzity fluorescence. Kvalita signálu odpovídá množství barviva, které se naváže na buněčnou membránu (Kamino et al., 1981; Obrázek 12).

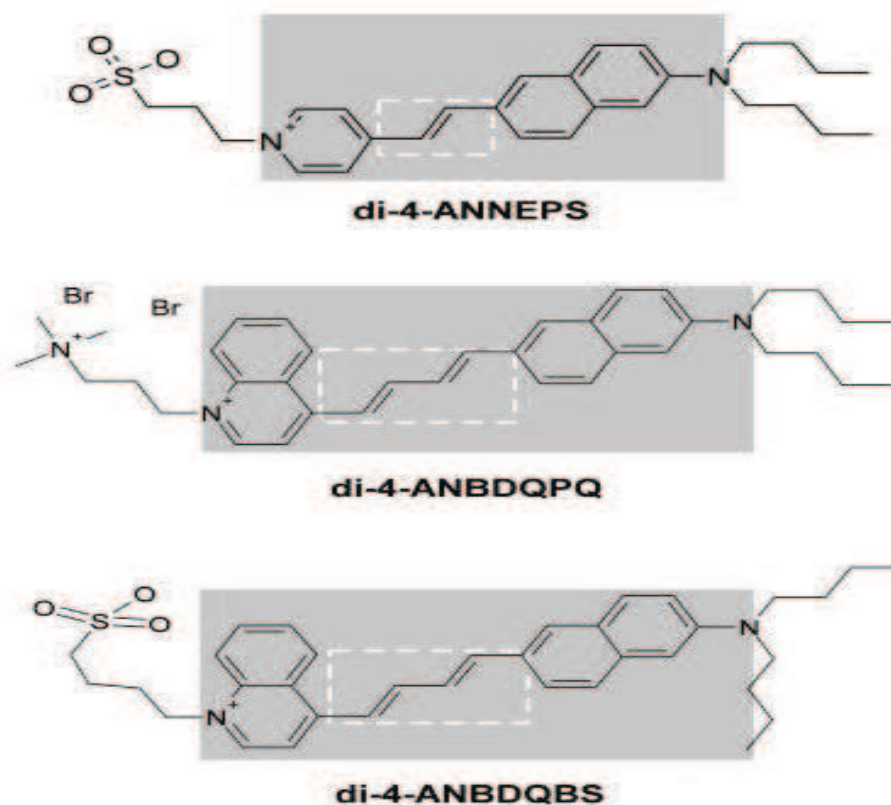


Technika a délka aplikace, stejně jako koncentrace barviva citlivého na napětí, se liší především dle velikosti orgánu, který pozorujeme. Při optickém mapování elektrofyzologie srdce dospělého jedince se využívá především perfuze pomocí mikropump. Nedoporučuje se prosté ponoření vzorku do barviva, citlivého na změnu napětí, vzhledem k horším výsledkům uniformity nabarvení vzorku i nutnosti 10 až 20x vyšší koncentrace barviva oproti aplikaci přes koronární tepny. Kvalita zaznamenaných signálů je u aplikace pomocí mikropumpy oproti prostému ponoření 5 až 20x vyšší, srovnáme-li odstup signálu od šumu (Salama 2001; Svrcek 2010).

V případě našeho pozorování ale pracujeme se srdeční tkání kuřecího embrya, jehož rozměry jsou natolik miniaturní, že prosté ponoření do barviva, citlivého na napětí, nám přináší velmi kvalitní signál. Kuřecí embryonální srdce na tomto vývojovém stádiu navíc ještě nemá vyvinuté koronární cévy, a proto nemůžeme využít kanylací.

Při našem pokusu jsme použili látku, která je známá pod firemním označením di-4-ANEPPS. Producentem je firma Invitrogen. Celým svým názvem je tato sloučenina označována jako 4-[2-[6-(dibutylamino)-2-naphthalenyl]ethenyl]-1-(3-sulfopropyl)pyridinium hydroxide. V katalozích jí můžeme nalézt pod označením CAS 90134-00-2 (Obrázek 13).





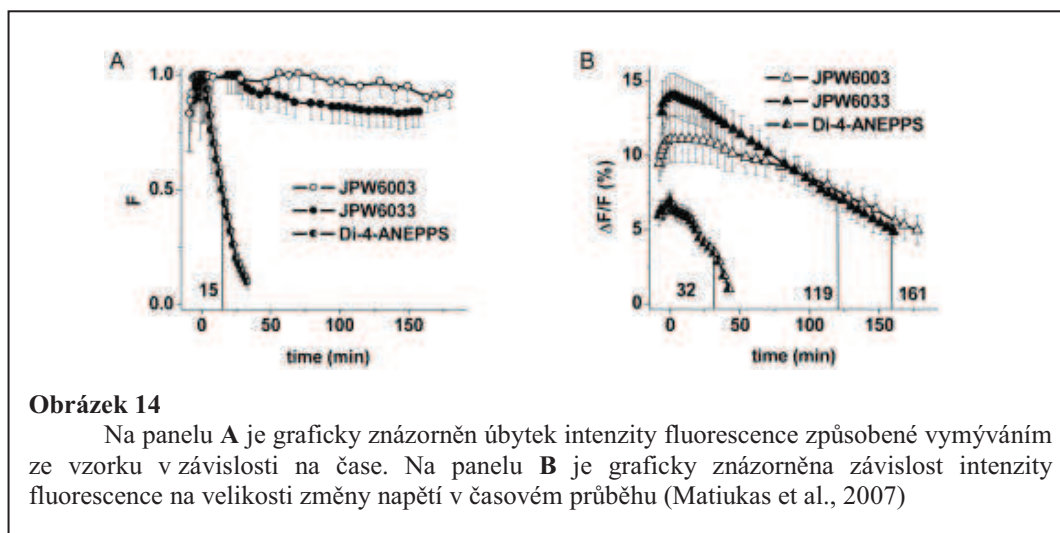
**Obrázek 13** Prostorový vzorec nejčastěji používaného barviva citlivého na napětí di-4-ANEPPS ve srovnání s novými barvivy di-4-ANBDQPQ a di-4-ANVDQBS (Matiukas et al., 2007)

Tato látka se naváže na buněčnou membránu a velice rychle dokáže reagovat na změny napětí v řádech menších než milisekunda. Di-4-ANEPPS má velmi konzistentní odpověď u rozdílných typů buněk a tkání. Vyznačuje se vysokou změnou fluorescence v závislosti na změně napětí ( $\Delta F/F \approx 8-15\%$ ) (INVITROGEN, 2011).

V historii používání barviv citlivých na napětí bylo využito poměrně velké množství látek. Z počátku tyto látky dosahovaly poměrně nízké citlivosti na změnu napětí. Např. barvivo Merocyanine 540, které bylo použito jako první pro měření akčního potenciálu, vykazovalo  $\Delta F/F \approx 1\%$ . Barvivo di-4-ANEPPS je v současnosti tím nejužívanějším (Svrcek 2010).

Neustále ale dochází k syntéze látek nových, jejichž vlastnosti se zdají být lepší než-li u zmiňovaného di-4-ANEPPS. Mezi jejich zástupci patří např. barviva

označována jako Di-4-ANBDQPQ a Di-4-ANBDQBS (Obrázek 12). U těchto látek byla zaznamenána lepší citlivost ( $\Delta F/F \approx 20\%$ ) i menší „washout“, čili pozvolnější úbytek intenzity fluorescence způsobené vymýváním ze vzorku. To nám umožňuje získání lepšího odstupu signálu od šumu (Matiukas et al., 2007; Obrázek 14).



Na izolované buňky se využívá lipofilnější di-8-ANEPPS. Tyto lipofilní vlastnosti s sebou ale pochopitelně přinášejí i své problémy v podobě špatné mísitelnosti s vodným roztokem.

Při výběru vhodného barviva citlivého na změnu napětí je důležitým faktorem též fototoxicita dané látky. Jedná se o velice zásadní negativní vlastnost, protože ovlivňuje elektrofiziologii srdce. Mechanismus této toxicity je na bázi uvolňování kyslíkových radikálů, které vznikají při excitaci chromoforu intenzivním světlem za přítomnosti kyslíku. Takto vzniklé volné kyslíkové radikály způsobují tukovou peroxidaci a denaturaci bílkovin (Salama 2001). Dříve používané barvivo Merocyan 540 vykazovalo poměrně vysokou hladinu fototoxicity. Studie fototoxicity u di-4-ANEPPS, která se prováděla na buňkách izolovaných z komor králičího myokardu, prokázala, že při barvení v koncentraci 30 či 60  $\mu\text{mol/l}$  po dobu 10 minut, nedochází ke změně tvaru akčního potenciálu. Toxicita se projevovala až při následném ozáření o intenzitě 1 W/cm<sup>2</sup>. U buňek myokardu došlo k prodloužení trvání akčního potenciálu, přítomnosti



abnormálních depolarizací, občas též k nemožnosti excitace. Přidáme-li antioxidant v podobě katalázy v koncentraci 100 IU/ml, dojde k opožděnému nástupu výše popsaných nežádoucích efektů (Schaffer et al., 1994).

V našem pokusu dochází ke kontaktu tkáně s barvivem pouze na krátkou dobu (zhruba 5 minut), čímž se snažíme minimalizovat možný vliv fototoxicity na experiment. Pro snímání virtuálními elektrodami bylo použito barvivo di-4-ANEPPS. Srdce je vloženo do roztoku di-4-ANEPPS v Tyrodes/Hepes pufru v poměru 1:20 (30  $\mu$ l : 600  $\mu$ l), kde se barví po dobu pěti minut. Po krátkém opláchnutí v čistém pufru Tyrodes/Hepes je přichyceno na dno tkáňové komůrky pokryté silikonovou gumou pomocí miniaturních entomologických špendlíků. Jelikož se jedná o delikátní práci, vyžadující značnou dávku přesnosti a trpělivosti, celý tento úkon se provádí pod disekčním mikroskopem sadou kvalitních pinzet.

Pro zajištění optimálních vitálních podmínek analyzovaného srdce kuřecího embrya je potřeba dosáhnout optimální teploty i okysličení. Zajištění vhodné teploty dosáhneme umístěním tkáňové komůrky s přišpendlenou tkání na elektricky vyhřívanou plotýnku. Ta udržuje teplotu lázně s Tyrodes/Hepes puftrem na 37°C. Dále je nutné roztok dostatečně okysličit, protože tkáň je citlivá na dodávku O<sub>2</sub>. Okysličení provádíme přívodem 100% O<sub>2</sub> z kyslíkové láhve tenkým infuzním setem přímo do tkáňové komůrky.

Je-li teplota i okysličení dostatečné, odpojíme přívod kyslíku, jelikož by probublávání roztoku způsobilo pohybové artefakty. Tkáňovou komůrku umístíme pod objektiv vysokorychlostní CMOS kamery a provádíme snímání propagace aktivační vlny po komoře srdce. Světlo dopadající na obarvenou srdeční tkáň vzniká v xenonové lampě a prochází přes filtr, který propouští pouze vlnové délky 480 – 550 nm. Při osvětlení tímto zeleným světlem odpovídá pokles intenzity červené fluorescence akčnímu potenciálu (Witkowski et al., 1997). Toto emitované světlo procházející přes filtr, jenž propouští pouze vlnové délky vyšší než 590 nm, zaznamenává CMOS senzor a získaná data zpracovává výkonný osobní počítač.

### ***Eliminace šumu – aplikace disociátoru***

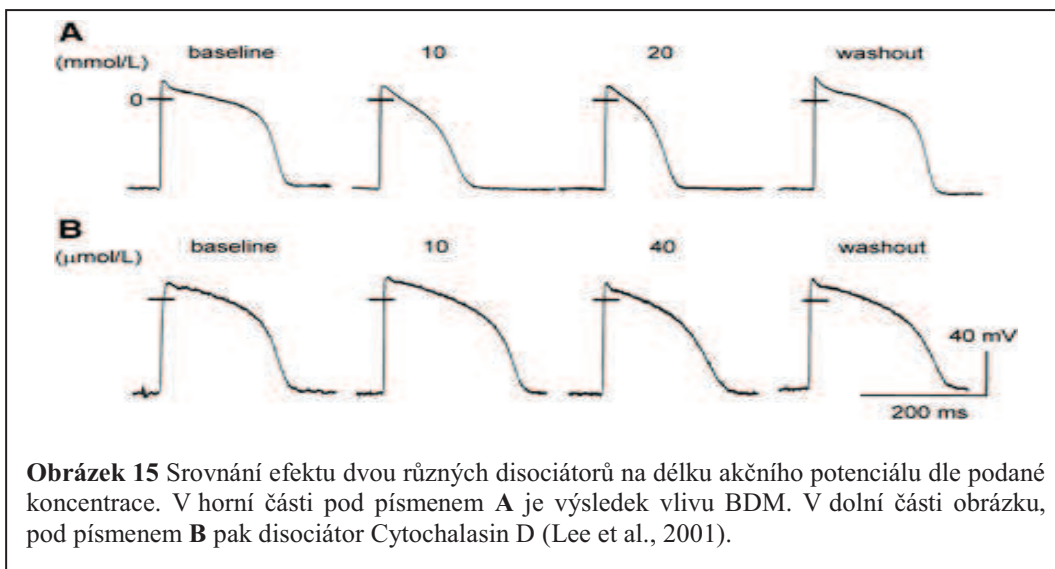
Vzhledem k faktu, že námi pozorovaný objekt je velice malý a napětí, které měříme na epikardu komory pomocí virtuálních elektrod má nízkou intenzitu, je zapotřebí co nejvíce eliminovat šum. Jedním z nejdůležitějších kroků pro získání optimálního poměru signálu k šumu je eliminace pohybových artefaktů. Toho docílíme jednak tím, že je pozorovaný objekt připevněn k silikonovému dnu tkáňové komůrky, a také díky farmakologickému zamezení aktivity srdečního svalu. Aplikace takového farmaka potlačuje mechanický pohyb myokardu během srdeční revoluce. Mělo by zaručit, že srdce při mapování vysokorychlostní digitální kamerou nebude měnit svou polohu a vytvářet tak pohybové artefakty. Zároveň se ale nesmí přerušit vznik a přenos akčního potenciálu po srdeční tkáni. Tyto látky zajišťují disociaci mechanické a elektrické aktivity a jsou označovány pojmem disociátory z anglického „uncouplers“ (Švrček, 2010). V dnešní době je na trhu hned několik látek, kterými můžeme kýženého efektu dosáhnout. Mezi nejčastěji používané disociátory pro aplikace optického mapování patří BDM, cytochalasin D a nedávno představený blebbistatin.

**BDM** (2,3-butanedione monoxime; CAS označení 57-71-6) je jedním z vůbec prvních disociátorů, které se využívaly v technikách optického mapování myokardu. Funkční princip této látky je založen na inhibici myozinové ATPázy (Backx et al., 1994). Dalšími podrobnými studiemi BDM se dospělo k závěru, že se nejedná o obecný inhibitor myozinové ATPázy, ale konkrétně inhibitor kosterních svalů myosin-II. Tento disociátor má také široce nespecifický vliv na celou řadu nemyozinových proteinů (Ostap 2002). Bylo také prokázáno velké množství nežádoucích účinků. Ukázalo se například, že při vyšších koncentracích, kdy je použita koncentrace BDM nad 10 mmol, dochází k ovlivnění vápníkových transientů. Aplikace tohoto farmaka způsobuje neselektivní snížení vodivosti některých membránových kanálů (Liu et al., 1993).

Vzhledem k přihlédnutí k výše zmíněným faktům jsem pro náš experiment BDM nepoužili. Raději jsme minimalizovali pohyb komory srdce pomocí modernějšího farmaka zvaného Cytochalasin D a to v koncentraci 10 – 80  $\mu\text{mol/l}$  podle stádia kuřecího zárodku.

**Cytochalasin D** (CAS označení 22144-77-0) je mykotoxin (produkt hub), který má schopnost prostoupit buňku a navázat se na aktinová vlákna. Dochází k potlačení asociace a disociace sub-jednotek, brání tak spojení aktinových vláken s vlákny myosinu (Biermann et al., 1998). Právě vytvoření vazby mezi aktinem a myosinem a ohnutí myosinové hlavice způsobuje kontrakci svalu. Je-li této vazbě zabráněno, nemůže dojít ke svalové kontrakci i při podráždění elektrickým potenciálem (Schneiber et al., 1998). S odkazem na výsledky některých šetření můžeme říci, že nebyl prokázán vliv Cytochalasinu D na délku akčního potenciálu ani jeho transmurální šíření. Na druhou stranu můžeme konstatovat, že účinnost na potlačení pohybových artefaktů je vysoká. (Biermann et al., 1998; Sakai 2006).

Pro srovnání vlivu BDM a Cytochalasinu D můžeme použít studii kolegů Lee et al z USA, kteří zkoumali vliv těchto dvou disociátorů na komorovou fibrilaci u prasečího srdce. Závěr jejich práce ukazuje, že Cytochalasinu D nemá prokazatelný vliv na komorovou fibrilaci. U BDM se naopak ukázalo, že velmi významně ovlivňuje délku akčního potenciálu, což mělo za následek přechod od ventrikulárních fibrilací, k ventrikulárním tachykardiím (Lee et al., 2001; Obrázek 15). Vliv BDM na zvýšenou genezi arytmií oproti Cytochalasinu D potvrzují i pozdější studie (Cheng et al., 2004).



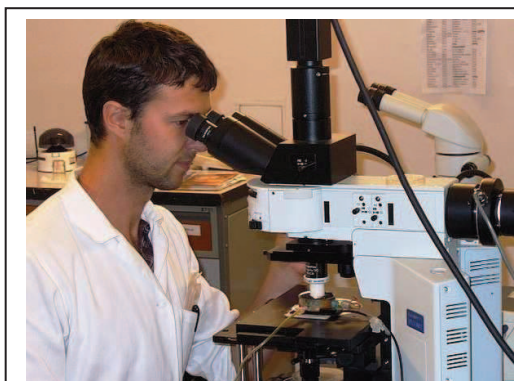
**Blebbistatin** (CAS označení 856925-71-8) je poměrně nový disociátor. Podle prvních výsledků studií, které byly provedeny, slibuje toto farmakum velmi dobrou alternativu k látkám výše uvedeným. Blebbistatin působí jednak jako inhibitor buněčného cyklu, ale také jako selektivní inhibitor ne-svalového Myosinu II a Myosinu II kosterního svalstva (Kovacs et al., 2004; Fedorov et al., 2007).

První výsledky prací, které se zaměřily na sledování účinků Blebbistatinu, naznačovaly, že toto farmakum nemá žádný vlivu na fyziologii vzniku a šíření akčního potenciálu na srdci (Fedorov et al., 2007). Nejnověji však články skupiny vědců z Japonska přináší výsledky negativního působení tohoto disociátoru v oblasti srdeční elektrofyzologie. Působením Blebbistatinu dochází častěji k tvorbě abnormální elektrické aktivity. Příčinou by mohla být porušená dynamika mezibuněčného kalcia po aplikaci Blebbistatinu (Kanlop et al., 2010).

Vzhledem k tomu, že velká část vědeckých týmů, které se zaměřují na optické mapování elektrofyzologie srdce, v současné době využívá disociátor Blebbistatin, je potřeba pokračovat ve výzkumu jeho vlastností na srdce. Toto farmakum je totiž v současnosti považováno v aplikacích optického mapování za pravděpodobně nejvhodnější volbu, není-li možná mechanická imobilizace, a proto i my jsme jej v nedávné době nahradili dříve používaným Cytochalasinem D (Sankova et al., 2010; Švrček, 2010).

### ***Optické mapování***

Pro vyšší kvalitu výsledného obrazu jsme použili imerzní techniku. Imerzní techniky slouží k realizaci maximální numerické apertury a ke zvýšení rozlišovací schopnosti. Využívají se především vodní a olejové imerzní techniky. My jsme při našem pozorování použili objektiv s vodní imerzí. Optická osa je

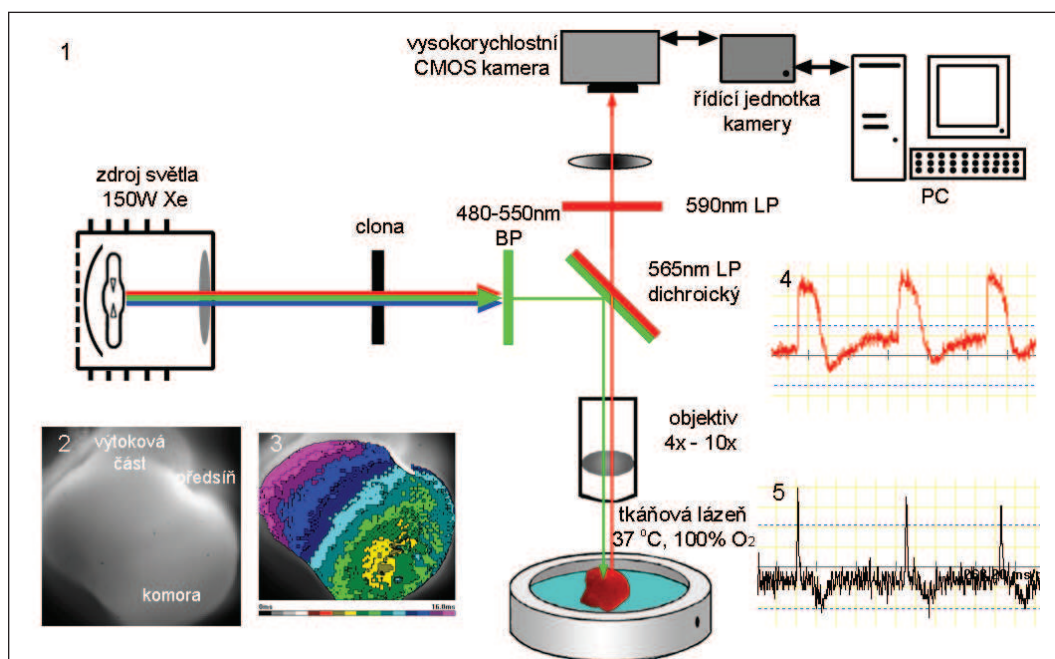


**Obrázek 16** Průběh optického mapování

symetrická: světlo prochází z buněk (ve vodě) do skla (krycí sklo), do vody (imerzní médium) a znovu do skla objektivu. Výhodou vodní imerze je, že zde není nebezpečí kontaminace fyziologického média a voda nemá na používaných vlnových délkách vlastní fluorescenci, která by mohla komplikovat interpretaci obrazů. Vodní imerze mají lepší výkon při rozlišení a korekcích aberace na úkor numerické apertury oproti olejové imerzi (NIKON, 2011).

Prostorová rozlišovací schopnost, která se nám podařila dosáhnout vodním imerzním objektivem s desetinásobným zvětšením, byla  $16\mu\text{m}$  a časové rozlišení bylo 1kHz.

Tkáňová komůrka se srdcem byla umístěna pod fluorescenční mikroskop, vycentrována na střed a zaostřena. Obraz, který snímá objektiv mikroskopu, byl přenesen na monitor počítače a zvolen příslušný filtr. Provedli jsme záznam délky 2-8s pomocí vysokorychlostní digitální kamery MiCAM ULTIMA L (Obrázek 17).



**Obrázek 17** Schéma námi používaného systému pro optické mapování. Na snímku číslo 1 vidíme řídicí jednotku CMOS kamery, zdroj světla, sadu filtrů a optických soustav. Dole je naznačeno srdce umístěné v lázni na vyhřívaném stolek epifluorescenčního mikroskopu. Panel 2 reprezentuje obraz ve viditelném světle. Na panelu 3 je znázorněna aktivace komory pomocí barevných izochron, jejichž časová posloupnost je uvedena na liště barev v dolní části. Profil intenzity jednoho pixelu vybraného z komory v závislosti na čase můžeme vidět na panelu 4. Derivací tohoto profilu získáme obraz reprezentující panel 5. Hrot znázorňuje místo největší změny v čase (Machálek 2008).

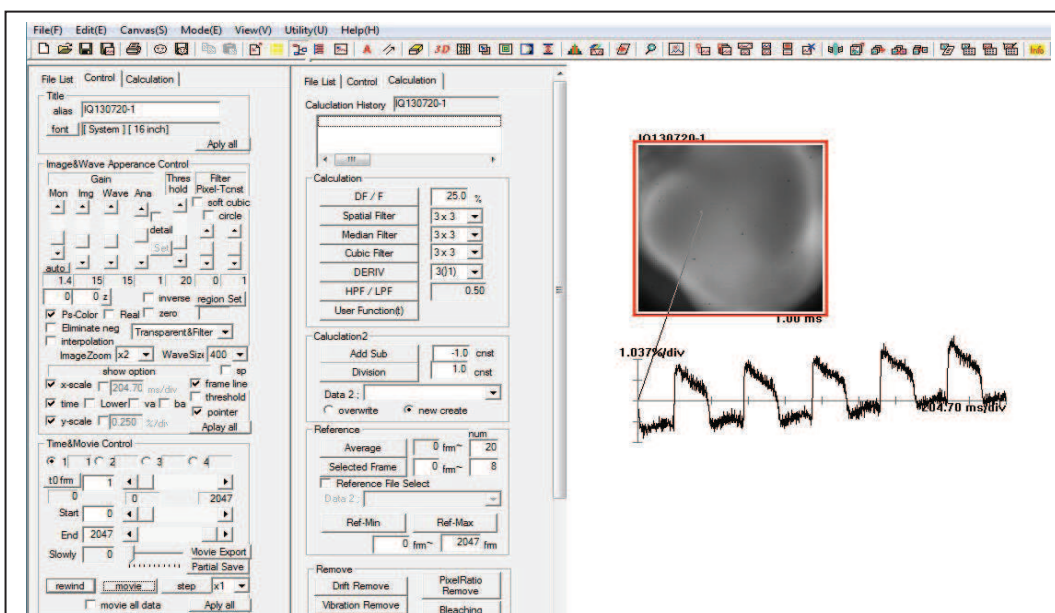
Pořízená data mají frekvenci 500 – 2000 obrázků /s. Čas i frekvence lze nastavit v řídicím programu MiCAM ULTIMA acquisition software, který je dodáván s kamerou. Pro okamžitou kontrolu kvality záznamu jsou v reálném čase vygenerovány profily intenzity jednotlivých pixelů v závislosti na čase. Je-li signál, který jsme pořídili, dostatečně zřetelný a ve velkém odstupu od šumu, uložíme měření do počítače a na velkokapacitní externí disk k pozdějšímu analyzování.

Tkáň srdce, jež byla podrobena optickému mapování, je ihned po ukončení měření vyňata z tkáňové komůrky a fixována vhodným fixačním médiem. Tím je zajištěna co nejmenší autolýza tkáně. Takto znehodnocená tkáň by pak nemohla být objektivně použita pro následné zkoumání histologie pomocí konfokálního mikroskopu, potažmo pro imunohistochemické reakce. Vzorky srdečních tkání, které byly zvoleny pro analýzu konfokálním mikroskopem, se fixovaly pomocí 4% paraformaldehydu. Jiné fixační médium bylo zvoleno pro standardní parafinovou histologii. V tomto případě se tkáň fixovala fixační směsí, známou pod označením Dentsův roztok. Jedná se o sloučeninu směs methanolu a dimethylsulfoxidu a to v poměru 4:1. Tkáň embryonálních srdcí na zvolených stádiích byla tímto způsobem fixována nejméně po dobu 24hodin.

### ***Analýza výsledků optického mapování***

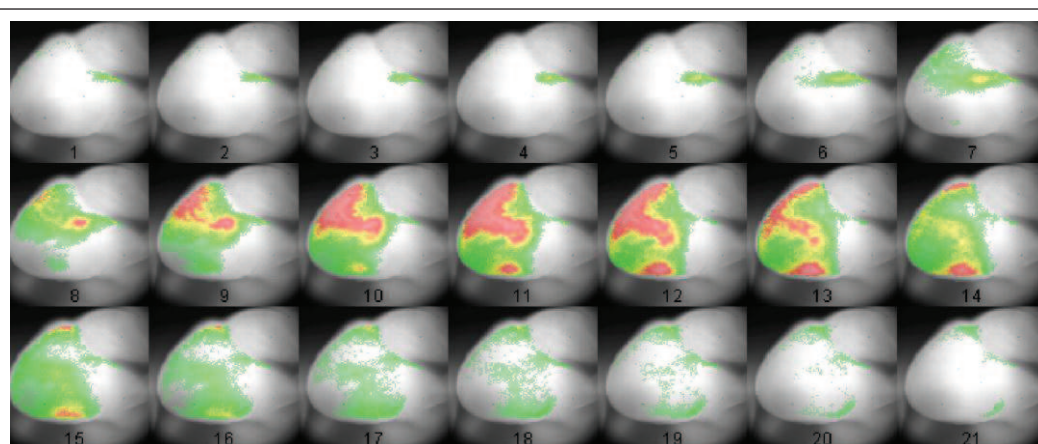
Data šíření akčního potenciálu po komoře srdce kuřecího zárodku, pořízená virtuálními elektrodami a zmapovanými vysokorychlostní CMOS kamerou, se dále zpracovávají v programu Brain Vision Analyser. Na srdeční komoře vybereme oblast, kde je dobrá kvalita signálu procházejícího akčního potenciálu. Na tento signál aplikujeme filtr dolní a horní propusti, který nám odstraní přebytečný šum o vysokých a nízkých frekvencích. Hledaná křivka se tak „vyhladí“ a signál bez nadbytečného zatížení šumem můžeme lépe použít k následné analýze. Nyní aplikujeme výpočet první derivace. Výsledkem je pík, jehož vrchol určuje maximální změnu rychlosti napětí a je obecně uznávaným kritériem pro stanovení okamžiku aktivace jednotlivých pixelů. Tímto krokem se prakticky každý pixel ze souboru 100x100, což odpovídá velikosti čipu naší kamery, stává neinvazivní, miniaturní virtuální elektrodou.





**Obrázek 18** Na obrázku můžeme vidět prostředí programu Brain Vision Analyser, ve kterém se provádí analýza výsledků optického mapování. Řada nástrojů v levé části a v horním panelu nám nabízí širokou paletu filtrů a výpočetních algoritmů pro úpravu signálu, dále zde můžeme nalézt množství funkcí pro práci s obrazovou informací. V pravé části můžeme vidět obraz srdce kuřecího embrya s výběrem jednoho pixelu (jedné virtuální elektrody) se záznamem průběhu akčního potenciálu v tomto bodě v čase.

Ze získaných dat lze pak softwarově dopočítat aktivační isochronní mapy. Ty můžeme doplnit o „color bar“, kde jednotlivé barvy odpovídají časovým intervalům, po které se šířil akční potenciál tkání srdeční komory. Zároveň lze vytvořit animace ukazující šíření akčního potenciálu v „on-line“ módu a určit tak přesné šíření akčního potenciálu po komoře srdce kuřecího embrya (Reckova et al., 2003; Sedmera et al., 2004; obrázek 19).



**Obrázek 19** Video aktivace komory rozložené na jednotlivé snímky – v tomto případě se jedná o aktivaci ve směru od primárního prstence, tzv. „primar ring“ aktivaci, typickou pro 4.ED. (Machálek 2008)

### 3.2.6. Konfokální mikroskopování

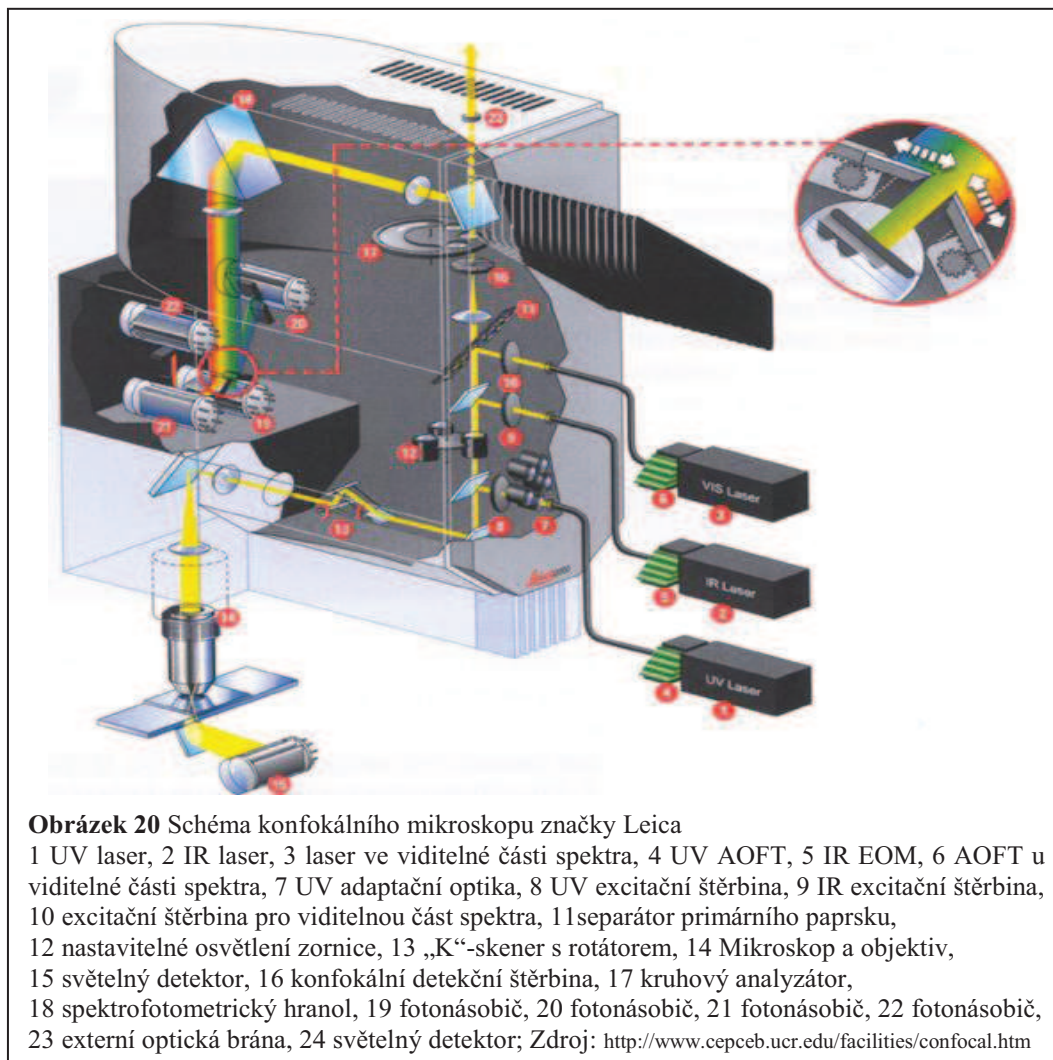
Vždy je vhodné podpořit výsledky funkčního výzkumu na tkáních též důkazy o změnách histologických. Získáme tak komplexní přehled o dané problematice, nikoli úzký pohled z jedné či druhé strany. Proto se kultivovaná i kontrolní srdce, podrobená optickému mapování, rychle ukládají do fixačního roztoku na dobu minimálně 24hodin. Pro embryonální srdce na vhodném vývojovém stádiu, která budeme analyzovat pomocí konfokálního mikroskopu, jsme zvolili jako fixační médium 4% paraformaldehyd. Chráníme tak tkáň před následnou autolýzou, která by znehodnotovala vzorek pro další zkoumání.

Jelikož srdeční tkáň vyvíjejícího se embrya je opravdu velmi delikátní, nejen svým rozměrem, ale i svou relativní křehkostí, je třeba při histologickém průkazu postupovat co nejcitlivěji. Předcházíme tak znehodnocení analyzované tkáně a tím i zvýšení kvality a signifikantnosti pořizovaných dat. Tuto tkáň lze zprůhlednit pomocí benzyl alkohol-benzyl benzoátu, takže ji můžeme podrobit konfokálnímu mikroskopování, díky kterému získáme sadu velmi tenkých řezů, aniž ji mechanicky poškodíme nožem mikrotomu. Výhodou srdeční tkáně je její schopnost autofluorescence. Tu lze u konfokálního mikroskopování využít. V našem experimentu jsme pracovali na konfokálním mikroskopu Leica SPE, který je instalován na půdě oddělení biomatematicky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR v Praze, Krči.

Konfokální mikroskop těží z principu zaostření laseru na malý objemový segment preparátu, na který je zaostřen i detekční systém (odtud název konfokální). Světelný zdroj se společně s detekčním systémem posouvají po preparátu (provádí tzv. scanning) a tím získávají obraz z celého pozorovaného objektu ve zvolené zaostřené rovině. Na základě toho může mít samotný preparát rozměry i stovky mikrometrů. Omezení tkví pouze v prostupnosti pro světlo, proto se také námi analyzovaný objekt zprůhlednil pomocí alkohol-benzyl benzoátu. Celý tento systém je řízen pomocí programu pracujícím na vysoce výkonném počítači. Lze zde nastavit velké množství parametrů včetně intervalu snímání optických řezů, filtrování šumu a uložení výsledných sad obrázků v digitalizované podobě. Ty jsou pak dále modifikovány dle potřeby v programu Adobe Photoshop. Zde můžeme využít širokou paletu možností úprav od



nastavení úrovně jasu a kontrastu přes využití zaostřovacích filtrů až po doplnění o popisky a montáže. (Miller et al., 2005; Jirkovská et al., 2006, Obrázek 20).



### 3.2.7. Imunohistochemie

Srdeční tkáň, na kterých jsme se rozhodli provést imunohistochemické reakce, byly po sejmutí průběhu akčního potenciálu na komoře, za pomoci optického mapování vysokorychlostní CMOS kamerou, fixovány v Dentsově roztoku nejméně po dobu 24 hodin. Poté byly převedeny vzestupnou alkoholovou řadou do 100% ethanolu. Fixativum Dents je složeno z 80% z methanolu a 20% z dimethyl-sulfoxidu. Z tohoto důvodu není zapotřebí, při odvodňování

vzestupnou alkoholovou řadou, začínat u alkoholů s nízkou koncentrací, ale tento fixační roztok můžeme ihned vyměnit za 90% ethanol, dále 96% a 100% (ten připravíme z průmyslově dodávaného 96% ethanolu za pomoci odstranění zbytkové vody bezvodným síranem měďnatým). Doba, po kterou jsou tkáně ponechány v daném roztoku ethanolu, je dána velikostí tkáně (10-30min.). 100% ethanol vyměníme pro zajištění co nejlepšího prosycení 2x až 3x. Nyní odsajeme všechn ethanol a místo něj do lahvičky se vzorky aplikujeme benzen - 3x po deseti minutách. Ten se dobře mísí s ethanolem, proto rychle prostoupí tkání a „zprůhlední“ ji. Poté odstraníme benzen a nahradíme jej rozpuštěným parafínem. Ten benzen vytěsňuje a prostoupí tkání. Tekutý parafín, stejně jako u předchozích látek, opakovaně vyměníme, abychom dosáhli co nejlepšího prosycení.

Tkáň se umístí a stranově orientuje do umělohmotného bločku, poté se zalije definitivní vrstvou parafínu. Takto připravený parafínový bloček, jenž obsahuje vždy jedno srdce, je připraven ke krájení na přístrojích s velmi ostrou čepelí, zvaných mikrotomy. Bločky krájíme rotačním mikrotomem na tenké řezy o tloušťce 5 mikrometrů a napínáme je na podložní sklíčko potažené Poly-L-lysinem. Tato látka umožňuje dobrou adhezi tkáně k podložnímu sklíčku i po odstranění parafínu z tkáně i jejího okolí.

Každý desátý řez byl orientačně podroben přehledné barvicí metodě, abychom byli schopni pod mikroskopem dobře rozeznat jednotlivé komponenty pozorované tkáně na řezu. Pro zvýraznění struktur používáme standardní kombinaci barviv Hematoxylin/Eosin. Hematoxylin je bazické přírodní barvivo, které se izoluje ze dřeva stromu *Hematoxylon campechianum*. Samotné nemá barvicí schopnosti, ty získává až po oxidaci vzdušným kyslíkem. Aby bylo schopno se vázat ke tkáni, je přidáno ještě mořidlo (soli hliníku, železa nebo wolframu). Tento komplex se dobře váže na basofilní struktury, jakým je např. jaderný chromatin. Kyselý Eosin se využívá spolu s basickým Hematoxylinem hlavně pro výrazný barevný kontrast a také proto, že oproti Hematoxylinu má schopnost barvit cytoplasmu buněk a mezibuněčnou hmotu pojiv. Hematoxylin barví v odstínech modré, Eosin v odstínech růžové až červené (Jirkovská et al., 2006). Sklíčka s fixovanou tkání zbavíme parafínu pomocí protažení řadou lázní s Bioclearem. Tato látka, vyrobená na přírodní bázi z kůry citrusových

plodů, nahradila oblíbený, ale zdraví nebezpečný xylen. Dále pokračujeme protahováním kádinkami se sestupnou řadou ethanolu. Následuje pětiminutová inkubace v pufru PBS a opláchnutí deionizovanou vodou. Poté provádíme samotné barvení. Čas pro dosažení kvalitního kontrastního výsledku je dán velikostí tkáně i kvalitou a stářím barviva. Hematoxylinem jsme barvili 35 sekund, nechali 6 minut pod tekoucí vodou a krátkým protažením diferencovali v kyselém alkoholu. U Eosinu trvalo barvení 10 sekund a po oplachu tekoucí vodou jsme diferencovali protažením v 80% ethanolu. Takto obarvené řezy kontrolujeme pod mikroskopem. Posledním krokem je protažení skel s řezy vzestupnou alkoholovou řadou, xylenem a zamontování pomocí permanentního montovacího média Depex pod krycí sklo.

Na zbylých neobarvených řezech, obsahujících oblast tkáně relevantní pro naše studium, byly provedeny dvě různé imunohistochemické reakce. Obecně bychom mohli imunohistochemickou reakci označit jako: „způsob identifikace buněčných či tkáňových antigenů pomocí specifické vazby antigenu a protilátky s následnou vizualizací komplexu antigen-protilátka“ (Jirkovská, 2006).

První z těchto dvou reakcí byl průkaz těžkých myosinových řetězců. Pro vyblokování specifických vazeb v tkáni bylo použito kozí sérum (NGS, Normal Goat Serum) v poměru 1:10 k 2%BSA (Bovine Serum Albumine) - hovězí sérový albumin v PBS. Jako primární protilátka byla použita protilátka proti těžkým myosinovým řetězcům typu IgG zvaná MF20 v poměru 1:10 k NGS 1:10 s 2%BSA v PBS. Po trojitém opláchnutí v PBS pufru byla aplikovaná sekundární protilátka (kozí proti myším imunoglobulinům) GaM IgG značená fluorescenčním barvivem Rhodamine Red. Po dalším trojitém oplachu v pufru se jádra dobarvila též fluorescenčním barvivem zvaným Hoechst 33342. Při dopadu světla ze rtuťové výbojky na preparát se bude místo lokalizace těžkých myosinových řetězců excitovat v zelené oblasti viditelného světla a vydávat červenou fluorescenci. Zatímco jádra obarvená Hoechestem budou excitovat na hladině připadající UV světlu a vydávat modrou fluorescenci. Skla byla opět zamontována permanentním montovacím médiem Depex. (Sedmera et al., 2002; 2006; Cheng et al., 2002).

Druhá imunohistochemická reakce, kterou byly podrobeny řezy srdeční tkáně je průkaz  $\alpha$ -Aktininu. Pro předinkubaci bylo použito opět NGS 1:10 s 2%BSA v PBS. Primární protilátka anti  $\alpha$ -Aktinin v koncentraci 1:1000 k NGS 1:10 s 2%BSA v PBS. Sekundární protilátka byla GaM značená fluorescenčním barvivem TRITC a jádra dobarveny Hoechstem. Při excitaci v zelené oblasti viditelného světla vydává  $\alpha$ -Aktinin červenou fluorescenci, zatímco jádra obarvená Hoechstem excitují na hladině připadající UV světlu a vydávají modrou fluorescenci. Výsledkem je vizualizace  $\alpha$ -Aktinin v červeném a jader v modrém podání. Skla byla opět zamontována pomocí permanentního montovacího média Depex (Sugi et al., 1992; Cheng et al., 2002, Machálek 2008).

### 3.3. Statistické vyhodnocení

#### 3.3.1. Pearsonův test dobré shody – Chí kvadrát ( $\chi^2$ )

Pearsonův test dobré shody (dále pouze jako  $\chi^2$  test) hledá řešení na otázku, zda pozorovaná data neodporují našim předpokladům. Princip  $\chi^2$  testu spočívá v tom, že srovnáváme vždy dvě skupiny proti sobě, zda odchylka odhadnuté hodnoty od té skutečně naměřené vznikla jen náhodně, nebo zda byl odhad špatný (Rovnice 1).

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{pozorovaná četnost} - \text{očekávaná četnost})^2}{\text{očekávaná četnost}}$$

**Rovnice 1** Výpočet  $\chi^2$  testu (Zvárová 1998)

Dosažením hodnot do vzorce pro výpočet  $\chi^2$  testu dostáváme hodnotu testového kritéria  $\chi^2$ . Tuto hodnotu dále porovnáváme s příslušným kvantilem  $\chi^2$  z tabulek (Tabulka 2). Zásadní je výběr správného počtu stupňů volnosti (df). Ten získáme v našem případě tak, že odečteme číslo 1 od celkového počtu možných variant šíření aktivační vlny po komoře srdeční. Takovéto vzory rozlišujeme 3, čili  $df = k - 1 = 2$ . Pohybujeme se tedy po druhém řádku tabulky dle hladiny významnosti. Na základě dosažené hladiny významnosti se rozhodujeme, kterou hypotézu zamítáme.

$\chi^2_{1-\alpha}(df)$	$\alpha$		
	0,05	0,01	0,001
1	3,84	6,63	10,83
2	5,99	9,21	13,82
3	7,81	11,34	16,27
4	9,49	13,28	18,47
5	11,07	15,09	20,5
⋮	⋮	⋮	⋮
100	124,34	135,81	149,45

**Tabulka 2** Kvantily  $\chi^2_{1-\alpha}$  rozdělení  $\chi^2$  o df stupních volnosti (Zvárová 1998)

## 4. VÝSLEDKY

Naším hlavním cílem bylo dokázat, že bez mechanického zatížení, které je způsobeno krevním oběhem pumpujícího srdce, se nebude PSS dále normálně vyvíjet. Porovnali jsme výsledky získané na normálně se vyvíjejících kuřecích srdcích *in vivo* a srdcích, které jsme ponechali bez mechanické zátěže a s mechanickou zátěží v kultivačním médiu po dobu 24hodin. Tyto výsledky vývoje PSS u kuřecího zárodku jsme srovnali jednak po stránce funkční měření akčního potenciálu šířícího se po srdeční tkáni a za pomoci CMOS kamery a jednak po stránce morfologické pomocí sekvence virtuálních řezů na konfokálním mikroskopu a provedením imunohistochemických reakcí. Na těchto výsledcích je jasně patrné, že srdce, která byla podrobena 24hodinové kultivaci a odpojena tak od mechanické zátěže pracovního myokardu, nepokračovala ve svém vývoji tak jako srdce kontrolní, která se dále vyvíjela přirozenou cestou. Nejenže u kultivovaných srdcí nedocházelo k dalšímu vývoji, nýbrž výsledky naznačují, že šlo dokonce o regresi ve vývoji PSS a s tím související vedení vzruchu převodním systémem včetně vývoje trabekulizace. Naopak srdce pod mechanickou zátěží (injektovaným silikonovým olejem) a přitom ponechané v kultivačním médiu po dobu 24hodin se ve vývoji PSS přibližovala normálnímu vývoji *in vivo*.

### 4.1. Inkubace 24hodin ze 3. na 4. den

V tomto období dochází v přirozených podmínkách u většiny srdcí kuřecího embrya k přeměně šíření akčního potenciálu ze zcela primitivního, kopírujícího srdeční kličku „od báze k hrotu“, po směr šíření od vznikajícího primárního prstence na vyvíjející se komoru, tzv. šíření „primární prstenec“.

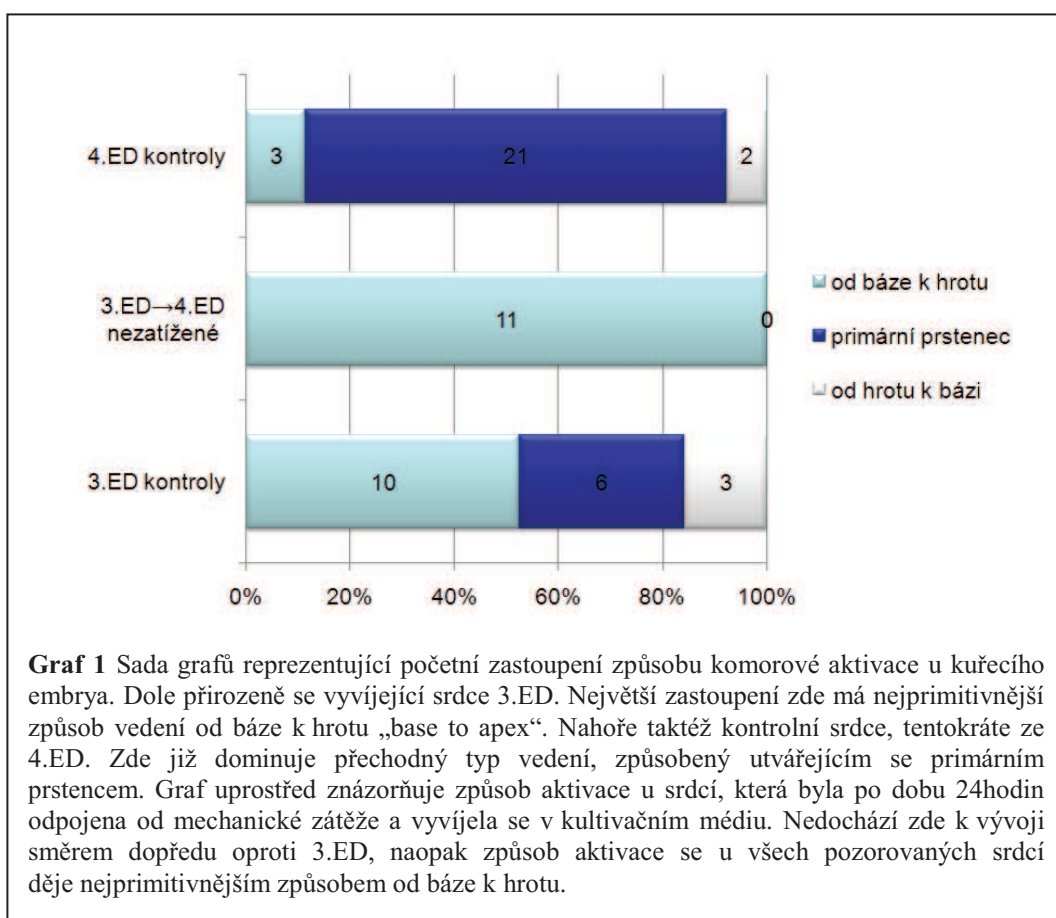
Optickým mapováním jsme se ujistili, že na kontrolách, které se vyvíjely *in ovo*, skutečně dochází na rozmezí těchto dvou dní k přeměně vedení akčního potenciálu ze vzoru „od báze k hrotu“ na vyšší úroveň v podobě vzoru šíření zvaného „primární prstenec“. Kuřecí embryonální srdce, která byla podrobena

kultivaci a byla tedy 24hodin bez mechanického zatížení, ale zároveň měla podmínky k růstu, byla skutečně ve svém vývoji oproti kontrolám opožděna.

Na kontrolních srdcích 3.ED jsme zaznamenaly z 53% nejprimitivnější způsob šíření „od báze k hrotu“, u 31% šíření „primární prstenec“ a u 16% „od hrotu k bázi“.

U srdcí 4.ED vzrostl výskyt šíření typu „primární prstenec“ na 81%, zatímco výskyt nejprimitivnějšího způsobu „od báze k hrotu“ výrazně poklesl k hodnotě 11%. Způsob šíření „od hrotu k bázi“ jsme zaznamenali u 8% pozorovaných kontrol.

V případě, že by mechanická zátěž neměla na vývoj PSS žádný vliv, odpovídaly by výsledky získané na kultivovaných srdcích ze 4.ED kontrolám. Závěr analýzy, aktivace komor u srdcí podrobených 24hodinové kultivaci bez zatížení mechanickou prací, tuto progresi nepotvrzuje. Ve 100% pozorování docházelo k nejprimitivnějšímu způsobu šíření aktivací vlny po komoře způsobem kopírujícím tok krve, tedy „od báze k hrotu“ (Graf 1).





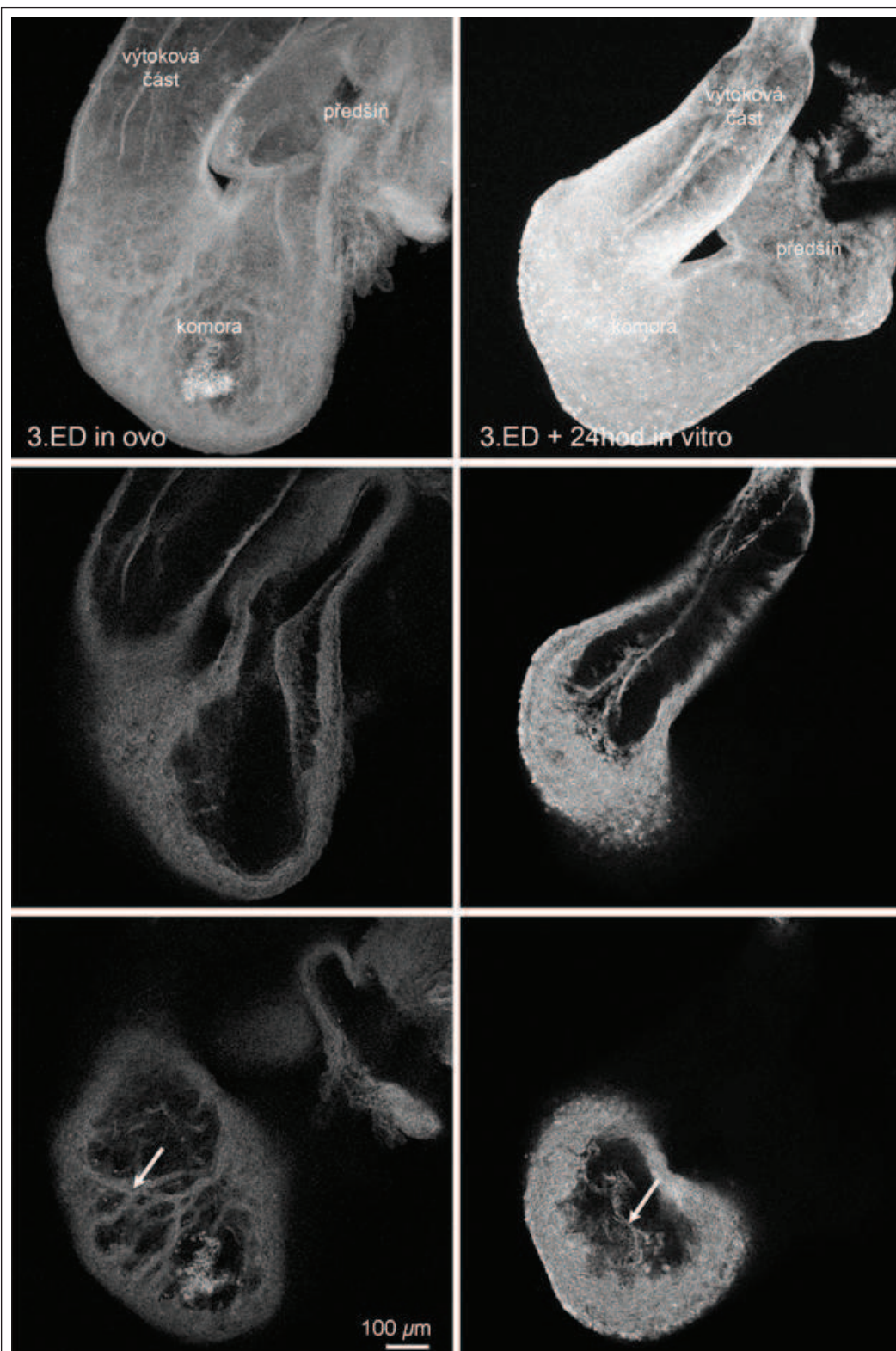
Výsledná pozorování jsme doplnili statistickou analýzou za použití Pearsonova  $\chi^2$  testu. Srovnáme-li statisticky skupinu srdcí, která byla ponechána bez mechanické zátěže po dobu 24 v kultivačním médiu se skupinou vyvíjející se *in ovo* stejného stáří (4.ED), dostáváme se hluboko pod 1% hladinu významnosti ( $P = 2,6 \times 10^{-6}$ ). Výsledek tedy můžeme označit za statisticky signifikantní. Tím potvrzujeme naši hypotézu, že pracovní zátěž je nezbytným prvkem pro normální vývoj PSS u kuřecího modelu.

Vzhledem k výsledkům tohoto pozorování se nabízí otázka, zda nepřítomnost mechanické zátěže nejenže nedovoluje další vývoj PSS, ale zároveň nezpůsobuje i regresi ve vývoji. Provedli jsme tedy opět statistickou analýzu. Porovnali jsme, zda spolu koreluje skupina srdcí vyvíjejících se *in vitro* se srdci *in ovo* ze 3.ED. Rozdílnost těchto dvou skupin je opět statisticky signifikantní, tentokrát pod 5% hladinu významnosti ( $P = 0.024$ ). Embryonální srdce, která se vyvíjejí bez mechanické zátěže v *in vitro* podmínkách, jsou tedy opožděna ve vývoji více jak o 1 ED.

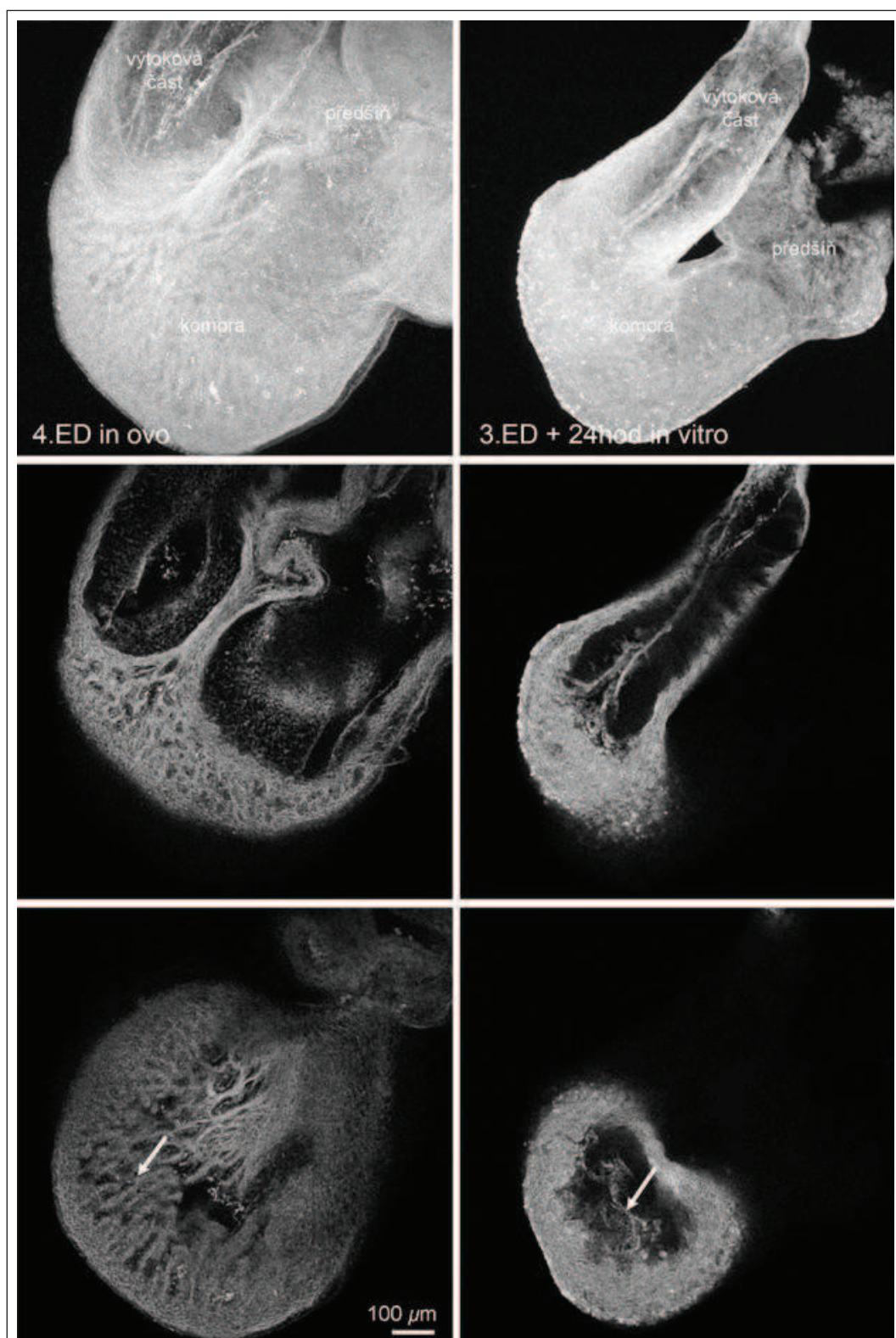
Tento závěr podporují i výsledky získané konfokálním mikroskopem. Oproti kontrolám z 3.ED, vyvíjejícím se přirozeným způsobem, má srdce ponechané navíc 24hodin v kultivačním médiu prodlouženou ale zkolabovanou výtokovou část. Nedochozí u něj k rozvoji trabekulizace, naopak v tomto směru došlo k dediferenciaci trámčiny v srdci. U srdcí ze 4.ED můžeme pozorovat bohatě rozvinutou výstavbu trabekul (Obrázek 21, 22).

Imunohistochemické analýzy protilátek proti těžkým myosinovým řetězcům (MF20) a  $\alpha$  – aktininu vykazují v oblasti výtokové části u kontrol výraznou cirkumferenciální orientaci myofibril, která je nahrazena u srdce kultivovaného po dobu 24 hodin houbovitou, značně izotropní strukturou. V oblasti komor je patrná kompaktizace trabekul. Disorganizace myofibril je vzhledem k časnosti stádia nevýrazná. Celkově není ani výrazný pokles intenzity signálu (Obrázek 23).



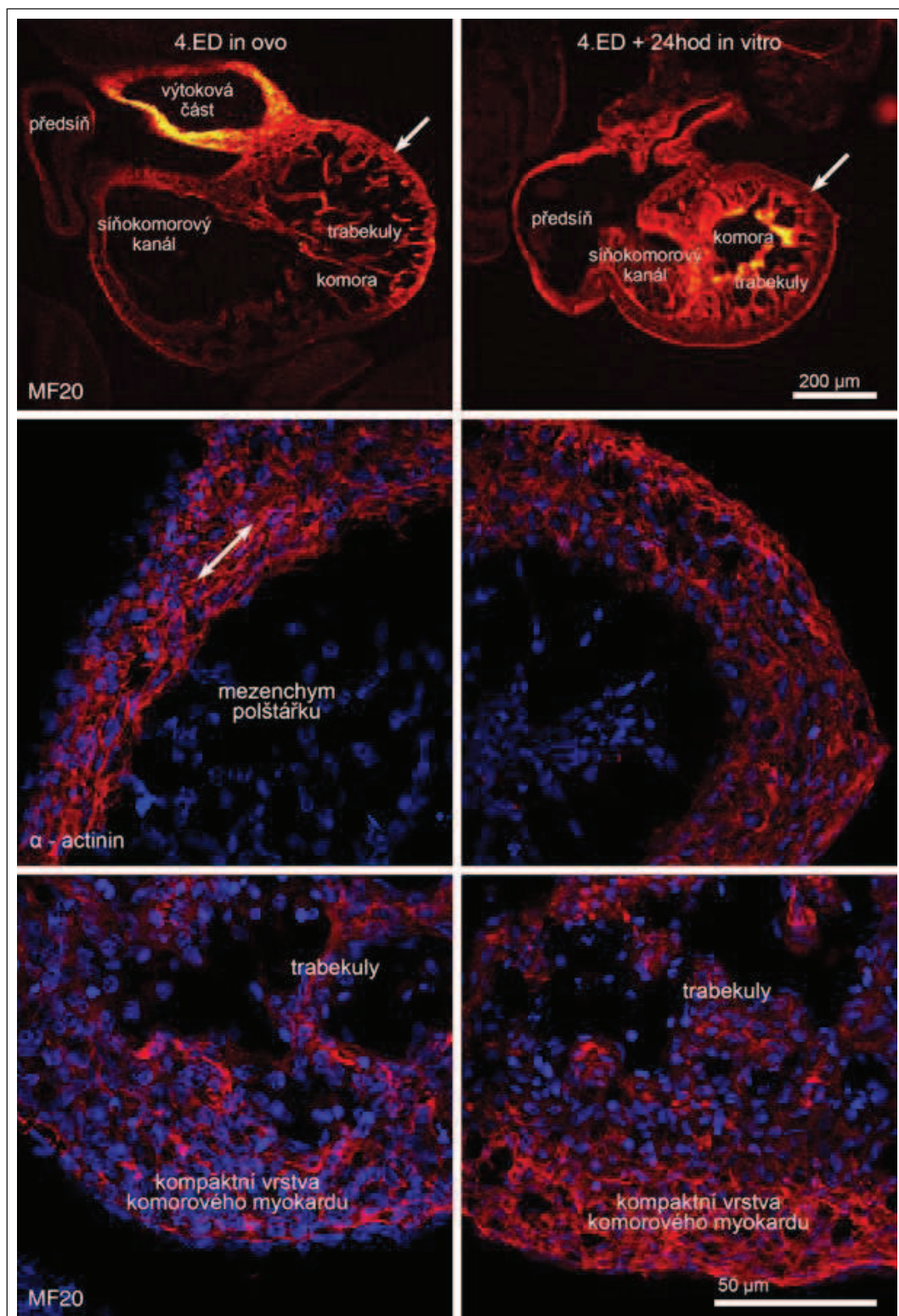


**Obrázek 21** Výsledky získané pomocí konfokálního mikroskopu. Porovnání přirozeně se vyvíjejícího srdce ze 3.ED (vlevo) a srdce ponechaného 24hodin v kultivačním médiu bez mechanické zátěže (vpravo). Šipka ukazuje dediferenciaci trabekulární architektury.



**Obrázek 22** Výsledky získané pomocí konfokálního mikroskopu. Porovnání přirozeně se vyvíjejícího srdce ze 4.ED (vlevo) a srdce ponechaného 24hodin v kultivačním médiu bez mechanické zátěže (vpravo). Šipka ukazuje dediferenciaci trabekulární architektury.





**Obrázek 23** Horní panel ukazuje ve falešných barvách intenzitu signálu protilátky proti těžkým myosinovým řetězcům (MF20). V oblasti výtokové části je patrna u kontrol výrazná cirkumferenciální orientace myofibril (dvouhlavá šipka, prostřední řada), která je nahrazena u srdce kultivovaného po dobu 24 h houbovitou, značně izotropní strukturou. V oblasti komor je patrná kompaktizace trabekul, disorganizace myofibril je vzhledem k časnosti stádia nevýrazná. Celkově není ani výrazný pokles intenzity signálu. Jádra jsou dobarvena interkalačním DNA barvivem Hoechst.

## 4.2. Inkubace 24 hodin ze 4. na 5. den

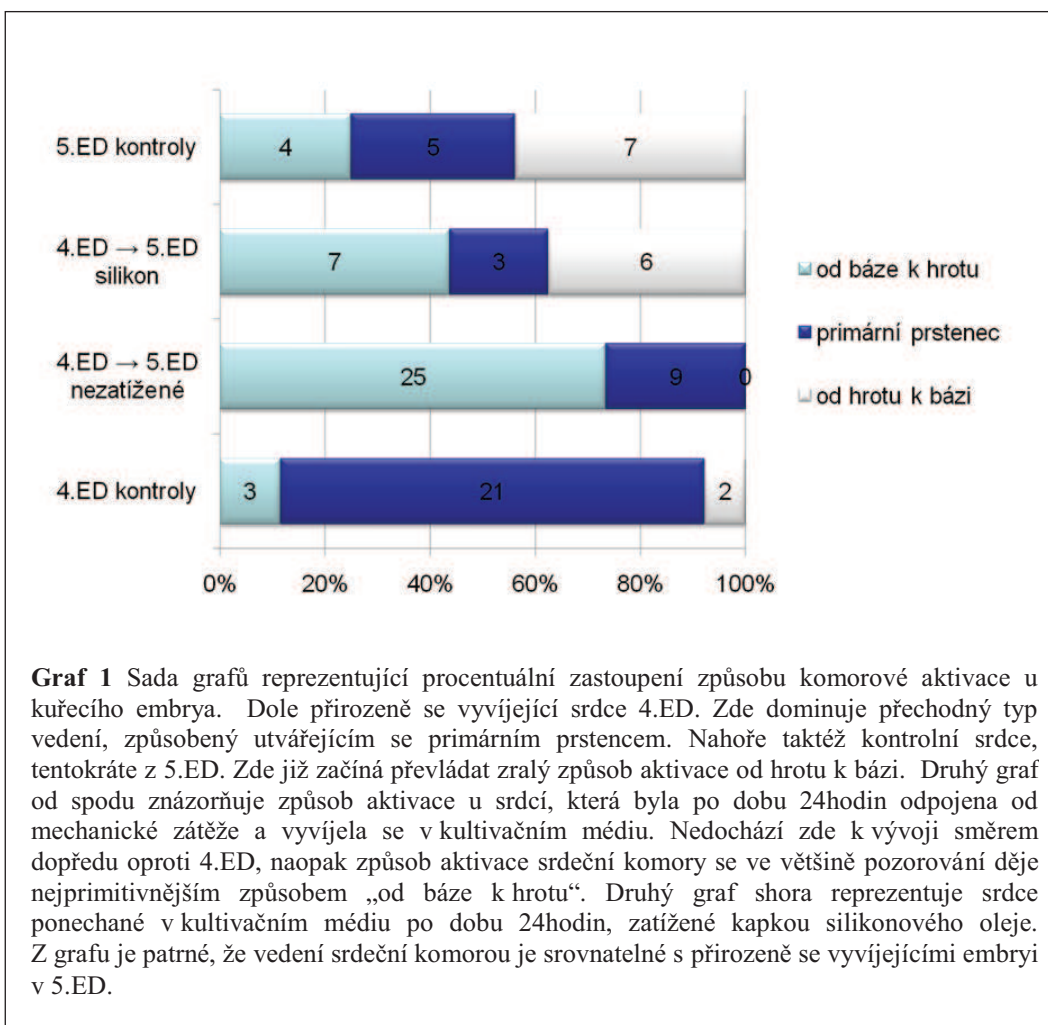
Díky neustále se vyvíjejícímu a morfologicky dokonaleji uspořádanému srdci dochází ze 4. na 5.ED ke změně v šíření akčního potenciálu po srdeční tkáni kuřecího zárodku. Jedná se o předěl z přechodného typu šíření zvaného „primární prstenec“ na již dokonalý způsob vedení „od hrotu k bázi“. Tato změna koreluje s vývojem Tawarových ramének v rámci PSS.

I v tomto případě jsme opět podrobili přirozeně se vyvíjející srdce *in ovo* optickému mapování, abychom podpořili naše tvrzení o přirozených pochodech a přeměnách v šíření vzruchu za normálních vitálních podmínek. U kontrol ze 4.ED byl výskyt šíření „primární prstenec“ v 81% případů, zatímco výskyt nejprimitivnějšího způsobu „od báze k hrotu“ byl již výrazně nízký, a to 11%. Zralý způsob šíření „apex to base“ jsme mohli pozorovat u 8% kontrol. Během 5.ED začal převládat nejzralejší a definitivní typ šíření a to „od hrotu k bázi“. Jeho výskyt byl u 44% pozorovaných srdcí. Variantu „primární prstenec“ bylo možno nalézt ve 31% pozorování a vzor „od báze k hrotu“ u 25% všech kontrol, jejichž stáří bylo na úrovni 5.ED.

Stejně jako u předchozího pozorování, i zde nás zajímal vliv mechanického zatížení na vývoj PSS. Proto jsme obdobným způsobem odpojili skupinu srdcí od krevního oběhu a kultivovali je po dobu 24 hodin *in vitro*, tentokrát ze 4.ED na 5.ED. V 74% pozorování byl výskyt nejprimitivnějšího šíření „od báze k hrotu“, pouze ve 26% případů jsme identifikovali zralejší způsob šíření „primární prstenec“. U žádného z analyzovaných srdcí se neobjevil zralý způsob šíření „od hrotu k bázi“, který je typický pro dané vývojové stádium. Výsledky stejně jako u předchozí skupiny potvrzují, že v těchto podmínkách nedocházelo k progresi ve vývoji, ale naopak se vývoj vrací na úroveň stádií předešlých. Statistická analýza pomocí  $\chi^2$  testu ukázala opět vysokou hladinu významnosti pod 1% ( $P = 6,18 \times 10^{-5}$ ).

Abychom vyloučili vliv kultivačního média a obecně podmínek *in vitro* kultivace na zkreslení výsledků, nechali jsme v témže kultivačním médiu, po dobu 24 hodin, kuřecí srdce podrobená mechanické zátěži silikonovým olejem.

Výskyt nejprimitivnějšího způsobu vedení „od báze k hrotu“ se vyskytoval ve 44% pozorování. Vyvrážděnější forma šíření aktivační vlny „Primární prstenec“ byl přítomen v 19% pozorování. Nejvyvrážděnější způsob vedení „Od hrotu k bázi“ se nám podařilo identifikovat v 37% měření. Tento výsledek se velmi přibližuje přirozenému vývoji PSS u kontrol z 5.ED. Rozdílnost těchto dvou skupin není statisticky signifikantní ( $P = 0.50$ ). Naopak rozdíl mezi srdci bez a s mechanickou zátěží, ve stejných in vitro podmínkách, je statisticky signifikantní pod 1% hladinou významnosti ( $P = 0,0007$ ); (Graf 2).



## 5. DISKUZE A ZÁVĚR

Důkladnou analýzou přirozeně se vyvíjejících srdcí kuřecího zárodku a srdcí, která byla podrobena odpojení od krevního oběhu a kultivována 24 hodin v kultivačním médiu bez mechanické zátěže a s mechanickou zátěží, máme možnost předložit objektivní důkazy o rozdílech ve vývoji PSS. Během výzkumu jsme se opírali o nejmodernější technologie, které má vědecká obec v České republice k dispozici a patří i na špici v celosvětovém měřítku. Zaměřili jsme se na oblast jak funkční, tak morfologickou. Díky vysokorychlostnímu optickému mapování CMOS kamerou se nám podařilo získat výsledky, které vypovídají o tom, že za podmínek odpojení od krevního oběhu (mechanické zátěže) na 24 hodin a kultivaci v kultivačním médiu, nedochází k vyzrávání PSS. Naopak dochází k regresi ve vývoji směrem k nejprimitivnějšímu vedení akčního potenciálu od báze směrem k hrotu „base to apex“. Náš závěr podpořily i výsledky z konfokálního mikroskopu, kde je pozorovatelná dediferenciace trabekulární výstavby. U imunohistochemických analýz můžeme v případě kultivovaných srdcí pozorovat v oblasti výtokové části houbovitou, značně izotropní strukturu, namísto výrazné cirkumferenciální orientace myofibril.

Vzhledem k faktu, že embryonální srdce nezatížená mechanickou prací byla kultivována po dobu 24 hodin v *in vitro* podmínkách, mohla by vyvstat pochybnost, zda za tímto opožděním ve vývoji stojí skutečně pouze odpojení od mechanické zátěže nebo hraje negativní roli samotné kultivační médium. I na tuto otázku se nám podařilo nalézt odpověď. Skupinu embryonálních kuřecích srdcí, které byly podrobeny kultivaci po dobu 24 hodin, jsme rozdělili na dvě skupiny – bez mechanické zátěže a zatížené kapkou silikonového oleje. Skupina, která byla podrobena zátěži, se přibližovala přirozeně se vyvíjejícím srdcím *in ovo*. Není tedy pochyb o tom, že vlastní vliv na vývoj PSS má mechanická zátěž.

Náš výsledek vlivu pracovní zátěže na diferenciaci PSS se tímto zařadil mezi již provedené pokusy, jako je podvázání konotrunků. To vedlo ke zvýšené tlakové zátěži a akceleraci růstu založené na proliferaci buněk. Důsledkem byla významná přestavba trabekulární architektury, což ukazuje na zrychlení morfogeneze. Došlo též k předčasnému objevení zralého typu funkce

His-Pukyňova systému vzhledem ke kontrolám (Clark et al., 1989; Sedmera et al., 1999; Reckova et al., 2003; Hall et al., 2004). Podobné výsledky byly získány po podvázání levé předsíně, čímž se snížily nároky na pracovní myokard levé komory. Toto bylo spojeno s významně zpožděnou přeměnou ve vedení od hrotu k bázi s úplnou inhibicí funkce levého Tawarova raménka. Srdce, podrobená podvazu levé předsíně, byla tedy opožděna oproti kontrolám (Reckova et al., 2003).

Oproti předchozím *in vivo* modelům se nám podařilo odlišit střížné napětí na endotelu od strečinku myocytů, z čehož plyne, že diferenciace PSS, alespoň ta časná, může fungovat též na principu buněčné autonomie.

Náš výsledek tedy doplnil další díl mozaiky v pochopení vlivu epigenetických faktorů na vznik a vývoj PSS u kuřecího modelu, který by do budoucna mohl být extrapolován na člověka a přispět tak k řešení otázek arytmií, potažmo kardiovaskulární morbidity a mortality jako takové.

Nový výzkum by mohl směřovat například do oblasti testování vlivu různých chemických látek, které by mohly ovlivnit prenatální vývoj PSS a narušit tak jeho přirozený vývoj.

Dalším zajímavým výzkumem, na kterém již nyní pracují různé odborné týmy, je nahrazení nefunkčního PSS biologickými pacemakery. Kardiostimulátory, které se v dnešní době používají, jsou stále menších rozměrů, lepších materiálů a disponují i funkcí autoregulace. Nicméně tato technologie skýtá řadu nevýhod, které by biologický pacemaker dokázal zcela eliminovat. Největší problém implantace nynějších pacemakerů je hlavně u dětských pacientů, pro které tento přístroj představuje celoživotní handicap v mnoha oblastech (reoperace, magnetické brány na letištích, vyšetření magnetickou resonancí aj.) Hlavními směry, kterými se výzkum biologického pacemakeru ubírá, je použití virových vektorů, embryonálních kmenových buněk a mezenchymálních kmenových buněk. Virové vektory by se využili při doručení příslušného genu do cílených regionů srdce. Embryonální kmenové buňky bychom mohli aplikovat na srdce a vytvořit tak přirozený PSS. Třetím směrem je využití mezenchymálních kmenových buněk jako platformy pro přenos genů pacemakeru do srdce založené

na spojích „gap junction“, kdy kmenová buňka a spárovaný myocit tvoří funkční jednotku pacemakeru (Rosen et al., 2007).

Dosažení výsledku takového rozsahu má před sebou ještě dlouhou cestu výzkumu, nicméně zdolání velkého cíle musí často předcházet množství cílů dílčích.



## 6. LITERATURA

### ČLÁNKY

- Arguello, C., et al., *Electrophysiological and ultrastructural study of the atrioventricular canal during the development of the chick embryo*. J Mol Cell Cardiol, 1986. 18(5): p. 499-510.
- Backx, P. H., W. D. Gao, et al. *Mechanism of force inhibition by 2,3-butanedione monoxime in rat cardiac muscle: roles of  $[Ca^{2+}]_i$  and cross-bridge kinetics*. J Physiol, 1994. 476(3): 487-500.
- Ben-Shachar, G., et al., *Ventricular trabeculations in the chick embryo heart and their contribution to ventricular and muscular septal development*. Circ Res, 1985. 57(5): p. 759-66.
- Biermann, M., et al., *Differential effects of cytochalasin D and 2,3 butanedione monoxime on isometric twitch force and transmembrane action potential in isolated ventricular muscle: implications for optical measurements of cardiac repolarization*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1998. 9(12): p. 1348-57.
- Clark, E.B., et al., *Effect of increased pressure on ventricular growth in stage 21 chick embryos*. Am J Physiol, 1989. 257(1 Pt 2): p. H55-61.
- Durrer, D., et al., *Epicardial excitation pattern as observed in the isolated revived and perfused fetal human heart*. Circ Res, 1961. 9: p. 29-38.
- Fedorov, V.V., Lozinsky, I.T., Sosunov, E.A. et al. *Application of blebbistatin as an excitation – contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts*. In Heart Rhythm, 2007, vol. 4, iss. 5, p. 619-626.
- Gorza, L., S. Schiaffino, and M. Vitadello, *Heart conduction system: a neural crest derivative?* Brain Res, 1988. 457(2): p. 360-6.
- Gourdie, R.G., et al., *The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system*. J Cell Sci, 1993. 105 ( Pt 4): p. 985-91.

- Gourdie, R.G., et al., *Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system*. Development, 1995. 121(5): p. 1423-31.
- Gourdie, R.G., et al., *Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(12): p. 6815-8.
- Gourdie, R.G., et al., *Development of the cardiac pacemaking and conduction system*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003. 69(1): p. 46-57.
- Hall, C.E., et al., *Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart*. Development, 2004. 131(3): p. 581-92.
- Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. . J. Morph, 1951. 88: p. 49-92.
- Cheng, G., et al., *Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage*. Development, 1999. 126(22): p. 5041-9.
- Cheng, G., et al., *Spatiotemporal and tissue specific distribution of apoptosis in the developing chick heart*. Dev Dyn, 2002. 223(1): p. 119-33.
- Cheng, Y., L. Li, et al. (2004). *Shock-induced arrhythmogenesis is enhanced by 2,3-butanedione monoxime compared with cytochalasin D*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286(1): H310-318.
- Chuck, E.T., et al., *Changing activation sequence in the embryonic chick heart. Implications for the development of the His-Purkinje system*. Circ Res, 1997. 81(4): p. 470-6.
- Chuck, E. T., K. Meyers, et al. *Transitions in ventricular activation revealed by two-dimensional optical mapping*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. 280(2): 990-1000.
- Kamino, K., A. Hirota, and S. Fujii, *Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye*. Nature, 1981. 290(5807): p. 595-7.

- Kamino, K., *Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development*. *Physiol Rev*, 1991. 71(1): p. 53-91.
- Kanlop, N., Sakai, T. *Optical mapping study of blebbistatin-induced chaotic electrical activities in isolated rat atrium preparations*. In *The Journal of Physiological Sciences*, 2010, vol. 60, iss. 2, p. 109-117, ISSN 1880-6546.
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C. et al. *Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II*. In *The Journal of biological chemistry*, August 2004, vol. 279, iss. 34, p. 35557–35563
- Kucera, J.P., A.G. Kleber, and S. Rohr, *Slow conduction in cardiac tissue, II: effects of branching tissue geometry*. *Circ Res*, 1998. 83(8): p. 795-805.
- LEE, M.H., LIN, S.F., OHARA, T. et al. *Effects of diacetyl monoxime and cytochalasin D on ventricular fibrillation in swine right ventricles*. In *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, vol. 280, iss. 6, p. 2689-2696.
- Liu, Y., C. Cabo, et al. (1993). *Effects of diacetyl monoxime on the electrical properties of sheep and guinea pig ventricular muscle*. *Cardiovasc Res* 27(11): 1991-1997.
- Machálek, J., *Vliv pracovní zátěže na vývoj převodního systému srdečního*. Bakalářská práce, 2008
- Matiukas, A., Mitrea, B.G., Qin, M. et al. *Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium*. In *Heart Rhythm*, 2007, vol. 4, iss. 11, p. 1441-1451.
- Miller, C.E., et al., *Confocal imaging of the embryonic heart: how deep?* *Microsc Microanal*, 2005. 11(3): p. 216-23.
- Moorman, A.F., et al., *Development of the cardiac conduction system*. *Circ Res*, 1998. 82(6): p. 629-44.
- Morley, G.E. and D. Vaidya, *Understanding conduction of electrical impulses in the mouse heart using high-resolution video imaging technology*. *Microsc Res Tech*, 2001. 52(3): p. 241-50.
- Ostap, E. M. (2002). *2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor*. *J Muscle Res Cell Motil* 23(4): 305-308.

- Raddatz, E., *Response of the embryonic heart to hypoxia and reoxygenation: an in vitro model*. Exp Clin Cardiol, 1997. 2: p. 128-134.
- Reckova, M., et al., *Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system*. Circ Res, 2003. 93(1): p. 77-85.
- Romano, R., et al., *Oxidative and glycogenolytic capacities within the developing chick heart*. Pediatr Res, 2001. 49(3): p. 363-72.
- Rosen, M.R., *Conference report: building a biologic pacemaker*. J Electrocardiol, 2007. 40: p. 197-198.
- Rosenbaum, D.S., *Optical mapping of cardiac excitation and arrhythmias*. In Optical Mapping of Cardiac, 2001, Chapter 2, p. 3.
- Sakai, T., *Cytochalasin D as the depressant of contraction for the optical monitoring of action potentials in isolated rat atrium*. In The journal of Physiological Sciences, 2006, vol. 56, iss. 5, p. 385-388, ISSN 1880-6546.
- Salama, G., *Optical mapping: background and historical perspective*. In Optical Mapping of Cardiac, 2001, Chapter 1, p. 9-31.
- Sankova, B., Machalek, J., et al., *Effects of mechanical loading on early conduction system differentiation in the chick*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 298(5): H1571-1576.
- Sedmera, D., et al., *A quantitative study of the ventricular myoarchitecture in the stage 21-29 chick embryo following decreased loading*. Eur J Morphol, 1998. 36(2): p. 105-19.
- Sedmera, D., et al., *Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions*. Anat Rec, 1999. 254(2): p. 238-52.
- Sedmera, D., et al., *Cellular changes in experimental left heart hypoplasia*. Anat Rec, 2002. 267(2): p. 137-45.
- Sedmera, D., P. Kucera, and E. Raddatz, *Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 283(2): p. R379-88.
- Sedmera, D., et al., *Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and Xenopus hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 284(4): p. H1152-60.

- Sedmera, D., et al., *Developmental transitions in electrical activation patterns in chick embryonic heart*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. 280(2): p. 1001-9.
- Sedmera, D., *Vývoj převodního systému srdečního u obratlovců*. Habilitační práce, 2004.
- Sedmera, D., et al., *Optical mapping of electrical activation in the developing heart*. Microsc Microanal, 2005. 11(3): p. 209-15.
- Sedmera, D., et al., *Current issues and perspectives in hypoplasia of the left heart*. Cardiol Young, 2005. 15(1): p. 56-72.
- Sedmera, D., et al., *Changes in activation sequence of embryonic chick atria correlate with developing myocardial architecture*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 291(4): p. H1646-52.
- Sedmera, D., *Development of cardiac conduction system in mammals with a focus on the anatomical, functional and medical/genetical aspects* Journal of APPLIED BIOMEDICINE, 2007. 5 (2007) (5): p. 115-123.
- Sedmera, D. and D. Kurkova, *[Functional and developmental view on Purkinje fibers system]*. Cas Lek Cesk, 2007. 146(9): p. 673-6.
- Sedmera, D. and D. Kurková, *Funkční a vývojový pohled na systém Purkyňových vláken*. Časopis lékařů českých, 2007. 146: p. 673-676.
- Sedmera, D., et al., *Cardiac expression patterns of endothelin-converting enzyme (ECE): Implications for conduction system development*. Dev Dyn, 2008. 237: p. 1746 –1753
- Schaffer, P., Ahammer, H., Müller, W. et al., *Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes*. In Pfügers Archiv European Journal of Physiology, 1994, vol. 426, iss. 6, p. 548-551, ISN 0031-6768.
- Schaefer, K.S., et al., *Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart*. Dev Dyn, 2004. 229(3): p. 489-99.
- Sugi, Y. and J. Lough, *Onset of expression and regional deposition of alpha-smooth and sarcomeric actin during avian heart development*. Dev Dyn, 1992. 193(2): p. 116-24.
- Suma, K., *Sunao Tawara: a father of modern cardiology*. Pacing Clin Electrophysiol, 2001. 24(1): p. 88-96.

- Švrček, M., *Nové přístupy pro optická měření elektrické aktivity myokardu*.  
Dizertační práce, 2010.
- Takebayashi-Suzuki, K., et al., *In vivo induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1*. Development, 2000. 127(16): p. 3523-32.
- Thompson, R.P., et al., *The oldest, toughest cells in the heart*. Novartis Found Symp, 2003. 250: p. 157-74; discussion 174-6, 276-9.
- Triedman, J.K., et al., *Efficacy of radiofrequency ablation for control of intraatrial reentrant tachycardia in patients with congenital heart disease*. J Am Coll Cardiol, 1997. 30(4): p. 1032-8.
- Witkowski, F.X., et al., Voltage-sensitive dye recordings of electrophysiological activation in a Langendorff-perfused mouse heart. Can J Cardiol, 1997. 13(11): p. 1077-82.

## KNIHY

- Bellairs R., Osmond M.: *The atlas of chick development*. Elsevier academic press, 2005. ISBN 0-12-084791-4
- Čihák R.: *Anatomie 3*. Grada, 2004. ISBN 80-247-1132-X
- Fejfar Z., Přerovský I. a kolektiv.: *Klinická fyziologie krevního oběhu*. Galén, 2002. ISBN 80-7262-130-0
- Barrett K.E., Barman S.M., Boitano S., Brooks H.L.: *Ganong's review of medical physiology – 23rd edition*. Lange basic science, 2010. ISBN 978-007-127066-3
- Jirkovská M. a kolektiv.: *Histologická technika*. Galén, 2006. ISBN 80-7262-263-3
- Shenasa M., Borggreffe M., Breithardt G. a kolektiv.: *Cardiac mapping*. Futura Publishing Co., 2003. ISBN 978-08-799-3404-0
- Schneiber M. a kolektiv.: *Funkční somatologie*. H&H, 1998. ISBN 80-86022-28-5
- Silbernagl S., Despopoulos A.: *Atlas fyziologie člověka*. Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X
- Štejska M. a kolektiv.: *Kardiologie*. Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1385-4

Trojan S. a kolektiv.: *Lékařská fyziologie*. Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5  
Zvárová J.: *Základy statistiky pro biomedicínské obory*. Karolinum, 1998. ISBN  
80-7184-786-0

## INTERNETOVÉ ODKAZY

Březina J., *Jak vybírat digitální fotoaparát III. - typ snímače* [online], [citováno 24.5.2001]. [http://www.grafika.cz/art/df/df\\_vyber\\_3.html](http://www.grafika.cz/art/df/df_vyber_3.html)

Dvořák D., *Světlocitlivé snímací prvky* [online], [citováno 15.02.2008].  
[http://www.digimanie.cz/art\\_doc-D80A41BB4E82A7AFC1256CC60031E152.html](http://www.digimanie.cz/art_doc-D80A41BB4E82A7AFC1256CC60031E152.html)

CCD.MII.CZ., *Úvod do techniky CCD čipů* [online], [citováno 07.03.2003].  
<http://ccd.mii.cz/art?id=303&cat=1&lang=405>

CZSO., *Demografická ročenka ČR 2009* [online], [citováno 2010].  
<http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/p/4019-10>

FERMENTEK BIOTECHNOLOGY., *Cytochalasin D* [online], [citováno 07.07.2010]. [http://www.fermentek.co.il/cytochalasin\\_D.htm](http://www.fermentek.co.il/cytochalasin_D.htm)

INVITROGEN., *di-4-ANEPPS* [online], [citováno 2011].  
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D1199?ICID=search-product>

NIKON., *Objektivy z vodní imerzí* [online], [citováno 2011].  
[http://www.nikoninstruments.eu/cz\\_CZ/Information-Center/Objektivy-s-vodni-imerzi](http://www.nikoninstruments.eu/cz_CZ/Information-Center/Objektivy-s-vodni-imerzi)

SCIMEDIA., [online], [citováno 2005]. <http://www.scimedia.com/fis/cardiac/ultima/feature.html>

Serych J., *CCD* [online], [citováno 2011]. <http://cs.wikipedia.org/wiki/CCD>

UZIS., *Zdravotnická ročenka České republiky 2009* [online], [citováno 17.12.2010]. <http://www.uzis.cz/publikace/zdravotnicka-rocenka-ceske-republiky-2009>

WHO., *Fact sheet Nr 317 – Cardiovascular diseases* [online], [citováno leden 2011]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>



## SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma přeměny myocyty v buňku PSS.	13
Obrázek 2 Schéma uspořádání převodního systému u člověka.	15
Obrázek 3 Aktivace přední strany komor u různých druhů obratlovců.	19
Obrázek 4 Vývojová stadia aktivace komor u kuřecího embrya.	21
Obrázek 5 Časová osa vývoje kuřecího zárodku.	28
Obrázek 6 Zátěž kuřecího embryonálního srdce kapkou silikonového oleje.	30
Obrázek 7 Princip aplikace silikonového oleje skrz předsín do komory srdce.	31
Obrázek 8 Funkce CCD snímače a posun náboje v jednotlivých krocích.	33
Obrázek 9 Základní principy snímání náboje CCD čipu.	34
Obrázek 10 Funkce čočky, lámající světlo do citlivé oblasti CCD nebo CMOS.	35
Obrázek 11 Výťažnost světelných zdrojů využívaných pro optické mapování.	37
Obrázek 12 Vazba barviva citlivého na napětí na membránu srdeční buňky.	38
Obrázek 13 Prostorové vzorce barviv citlivých na napětí.	39
Obrázek 14 Kvalitativní rozdíly mezi různými barvivy citlivými na napětí.	40
Obrázek 15 Srovnání efektu dvou různých disociátorů na délku AP	43
Obrázek 16 Průběh optického mapování	44
Obrázek 17 Schéma námi používaného systému pro optické mapování.	45
Obrázek 18 Prostředí programu Brain Vision Analyser	47
Obrázek 19 Video aktivace komory rozložené na jednotlivé snímky	47
Obrázek 20 Schéma konfokálního mikroskopu značky Leica	49
Obrázek 21 Výsledky získané pomocí konfokálního mikroskopu (3.ED).	57
Obrázek 22 Výsledky získané pomocí konfokálního mikroskopu. (4.ED).	58
Obrázek 23 Výsledky protilátky proti těžkým myosinovým řetězcům (MF20).	59

## 7.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ATP** – adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
- BSA** – bovine serum albumin (albumin hovězího séra)
- CCD** – charge coupled device (prvek s nábojovou vazbou)
- CCS** – cardiac conduction system (převodní systém srdeční)
- CMOS** – complementary metal-oxide semiconductor  
(technologie polovodičů s vrstvou kysličníku křemíku)
- ČSU** – Český statistický úřad
- di-4-ANEPPS** – di-4-aminonaphthylethenylpyridinium propanesulfonate
- DMEM** - Dulbecco's modified eagle's médium
- ED** – embryonální den
- EKG** – elektrokardiograf
- ET** – endothelin
- ECE** – endothelin-converting enzyme (endothelin konvertující enzym)
- ITS** – insulin-transferin-selenium médium
- HH** – klasifikace stádií vývoje kuřecího embrya dle **H**amburgera & **H**amiltona
- IgG** – imunoglobulin **G**
- mV** – miliVolt
- NGS** – normal goat serum (normální kozí sérum)
- pH** – potential of hydrogen (vodíkový exponent)
- PBS** – phosphate buffer saline (fosfátový pufr)
- PSS** – převodní systém srdeční
- TRITC** – Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
- Úzis** – Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
- UV** – ultraviolet (ultrafialový)
- $\Delta F/F$**  - zlomková změna absorpce / fluorescence na změnu akčního napětí